



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.05.29

(21) Номер заявки
202090638

(22) Дата подачи заявки
2018.11.01

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/580,667; 62/697,145

(32) 2017.11.02; 2018.07.12

(33) US

(43) 2020.08.18

(86) PCT/GB2018/053165

(87) WO 2019/086878 2019.05.09

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ОКСФОРД БИОТЕРАПЬЮТИКС
ЛТД (GB)**

(72) Изобретатель:
**Бишт Арнима, Дусек Рэйчел, Хуан
Хайнин, Ханнум Чак (US), Экройд
Джеймс, Дебан Ливия (GB)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) WO-A1-2016154341
WO-A2-2009029883
BOLES KENT S ET AL.: "The tumor suppressor TSLC1/NECL-2 triggers NK-cell and CD8(+) T-cell responses through the cell-surface receptor CRTAM", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 106, no. 3, 1 August 2005 (2005-08-01), pp. 779-786, XP002550646, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/BL00D-2005-02-0817 [retrieved on 2005-04-05]

abstract, p. 780 paragraph bridging the left- to the right-hand column, p. 781 left-hand column last full paragraph, paragraph bridging p. 781 to p. 782-784 left-hand column last full paragraph, discussion and fig. 1-5

ARASE NORIKO ET AL.: "Heterotypic interaction of CRTAM with Necl2 induces cell adhesion on activated NK cells and CD8(+) T cells", INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, OXFORD UNIVERSITY PRESS, vol. 17, no. 9, 1 September 2005 (2005-09-01), pages 1227-1237, XP002428924, ISSN: 0953-8178, DOI: 10.1093/INTIMM/DXH299 abstract, p. 1228 right-hand column first full paragraph, p. 1236 right-hand column first - fourth full paragraphs and fig. 2-4

HYE-RAN KIM ET AL.: "IGSF4 is a novel TCR [zeta]-chain-interacting protein that enhances TCR-mediated signaling", THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 208, no. 12, 14 November 2011 (2011-11-14), pages 2545-2560, XP055534036, US ISSN: 0022-1007, DOI: 10.1084/jem.20110853, the whole document
WO-A2-2005012530

GALIBERT L ET AL.: "Nectin-like protein 2 defines a subset of T-cell zone dendritic cells and is a ligand for class-I-restricted T-cell-associated molecule", J. BIOL. CHEM., vol. 280, no. 23, 21 March 2005 (2005-03-21), pages 21955-21964, XP003000772, ISSN: 1083-351X, DOI: 10.1074/JBC.M502095200, the whole document

(57) В изобретении описаны антитела против CRTAM, нуклеиновые кислоты, кодирующие такие антитела, клетки-хозяева, содержащие такие нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело, способы получения антител против CRTAM и способы лечения заболеваний, например рака человека, включая мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого (включая плоскоклеточный рак и аденокарциномы), рак кожи, включая меланому, рак молочной железы (включая TNBC), рак ободочной и прямой кишки, рак желудка, рак яичника, рак шейки матки, рак предстательной железы, рак почки, рак печени, включая гепатоцеллюлярную карциному, рак поджелудочной железы, рак головы и шеи, рак носоглотки, рак пищевода, рак мочевого пузыря и другие виды уроэпителиального рака, а также рак желудка, глиому, глиобластому, рак яичка, рак щитовидной железы, рак костей, рак желчного пузыря и желчных протоков, рак матки, рак надпочечников, саркомы, ЖКСО (GIST), нейроэндокринные опухоли и гематологические злокачественные новообразования, но не ограничиваясь указанными.

Область техники

Изобретение относится к антителам, способным связываться с белком CRTAM, и их применению.

Введение

Аспекты настоящего изобретения включают антитела и другие терапевтические белки против CRTAM, нуклеиновые кислоты, кодирующие такие антитела и терапевтические белки, способы получения антител и других терапевтических белков и способы лечения заболеваний, например, рака, с применением антител и других терапевтических белков против CRTAM.

Уровень техники

Антиген-мишень CRTAM представляет собой однопроходный мембранный белок I типа семейства нектинов с V- и C1-подобными Ig-доменами (Yeh et al., Cell. 2008 Mar 7; 132(5): 846-5). Его ген впервые идентифицировали в активированных NKT-клетках мыши и человека (Kennedy et al, J Leukoc Biol. 2000 May;67(5):725-34); последующие исследования показали, что его экспрессия строго регулируется активацией и ограничивается активированными клетками, ограниченными по MHC I класса, включая NKT и CD8 T-клетки (Patiño-Lopez et al., J Neuroimmunol. 2006 Feb;171(1-2):145-55).

Единственным известным лигандом CRTAM является Necl2 (Galibert et al., J Biol Chem. 2005 Jun 10;280(23):21955-64), и считается, что взаимодействие между лигандом и рецептором является предпочтительным по сравнению с гомофильными взаимодействиями любой из этих молекул. (Zhang et al, Structure. 2013 Aug 6;21(8): 1430-9). Предполагается, что взаимодействие CRTAM-Necl2 способствует возникновению зрелого иммунного синапса и способствует стимуляции T-клеток непрофессиональными АПК. Данная функция также обнаружена в NK-клетках, где антитела к CRTAM стимулировали цитотоксичность NK-клеток (Boles et al., Blood. 2005 Aug 1;106(3):779-86). В заявке WO 2009/029883 описано, что CRTAM активируется на конкретном наборе T-клеток и селективно регулирует некоторые цитокины, включая ИФН- γ , ИЛ-22 и ИЛ-17.

В заявке WO2016/154341 описано, что агонистические антитела против CRTAM можно применять для лечения рака за счет увеличения ADCC-потенциала иммунных эффекторных клеток, например, NK-клеток.

Краткое описание изобретения

Аспекты настоящего изобретения включают специфичные антитела против CRTAM, нуклеиновые кислоты, кодирующие такие антитела согласно настоящему изобретению, клетки-хозяева, содержащие такие нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело согласно настоящему изобретению, способы получения антител против CRTAM и способы лечения заболеваний, например, рака человека, включая мелко-клеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого (включая плоскоклеточный рак и аденокарциномы), рак кожи, включая меланому, рак молочной железы (включая TNBC), рак ободочной и прямой кишки, рак желудка, рак яичника, рак шейки матки, рак предстательной железы, рак почки, рак печени, включая гепатоцеллюлярную карциному, рак поджелудочной железы, рак головы и шеи, рак носоглотки, рак пищевода, рак мочевого пузыря и другие виды уротелиального рака, а также рак желудка, глиомы, глиобластомы, рак яичка, рак щитовидной железы, рак костей, рак желчного пузыря и желчных протоков, рак матки, рак надпочечников, саркомы, ЖКСО (GIST), нейроэндокринные опухоли и гематологические злокачественные новообразования, но не ограничиваясь указанными.

В настоящем изобретении предложено антитело, связывающееся с CRTAM (SEQ ID NO:11). Указанное антитело предпочтительно связывается с внеклеточным доменом CRTAM (SEQ ID NO:12). Аспекты настоящего изобретения включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающееся с эпитопом белка CRTAM, распознаваемым антителом, описанным в настоящем изобретении, или перекрестно конкурирующее за связывание с антителом, описанным в настоящем изобретении, и предпочтительно сохраняющее по меньшей мере приблизительно 80, по меньшей мере приблизительно 85, по меньшей мере приблизительно 90, по меньшей мере приблизительно 91, по меньшей мере приблизительно 92, по меньшей мере приблизительно 93, по меньшей мере приблизительно 94, по меньшей мере приблизительно 95, по меньшей мере приблизительно 96, по меньшей мере приблизительно 97, по меньшей мере приблизительно 98 или, по меньшей мере приблизительно 99% сродства связывания антитела, описанного в настоящем изобретении, с CRTAM человека. В некоторых вариантах реализации антитело представляет собой выделенное антитело.

Аспекты настоящего изобретения включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающееся с CRTAM, причем указанное антитело содержит варибельную область тяжелой цепи, содержащую: последовательность CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:5; последовательность CDR-H2, содержащую SEQ ID NO:6; и последовательность CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:7. В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит варибельную область легкой цепи, содержащую по меньшей мере одну последовательность CDR, выбранную из группы, состоящей из: CDR-L1, содержащей любую из последовательностей SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:15; CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:9; и CDR-L3, содержащую любую из последовательностей SEQ ID NO:10 или SEQ ID NO:16.

В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающееся с CRTAM, содержит варибельную область тяжелой цепи и варибельную область легкой цепи,

содержащую одну из 4 комбинаций CDR тяжелой и легкой цепи, показанных в табл. 1.

Таблица 1

	CDR вариательной области тяжелой цепи			CDR вариательной области легкой цепи		
	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3
1	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:10
2	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:16
4	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:16
5	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:10

В некоторых предпочтительных вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающееся с CRTAM, содержит вариательную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, содержащую SEQ ID NO:5; CDR-H2, содержащую SEQ ID NO:6; и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO:7; и вариательную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, содержащую SEQ ID NO:8; CDR-L2, содержащую SEQ ID NO:9; и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO:10.

В еще одном предпочтительном варианте реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающееся с CRTAM, содержит вариательную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, содержащую SEQ ID NO:5; CDR-H2, содержащую SEQ ID NO:6; и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO:7; и вариательную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, содержащую SEQ ID NO:15; CDR-L2, содержащую SEQ ID NO:9; и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO:16.

В дополнительном аспекте антитела или их антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению содержат CDR вариательных цепей, сопоставляемые с исходным антителом, описанным в настоящем изобретении. Таким образом, настоящее изобретение относится к вариантным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим варианты вариательные области исходного антитела, причем исходное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариательную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:5; последовательность CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:6; и последовательность CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:7; и вариательную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:15; CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:9; и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:16, причем в одном варианте реализации вариантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислотных замен, добавлений и/или делеций в любом одном или более из них; или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 аминокислотных замен, добавлений и/или делеций в совокупности; набор CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащий от 1 до 5 или от 1 до 4 или от 1 до 3 замен, добавлений или делеций конкретного назначения, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент сохраняет способность к специфичному связыванию с CRTAM. Вариации предпочтительно представляют собой замены, замены предпочтительно представляют собой консервативные замены или замены для преобразования аминокислоты в вариательной области обратно в соответствующую аминокислоту из зародышевой линии человека. В дополнительном варианте реализации вариантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению содержит: последовательность CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:5; последовательность CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:6; и последовательность CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:7; и вариательную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:15; CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:9; и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:16, причем одна или более из указанных последовательностей CDR изменены таким образом, что они приблизительно на 70, 75, 80, 85, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентичны соответствующей исходной последовательности CDR, указанной выше.

В некоторых вариантах реализации предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее вариательную область тяжелой цепи, описанную в SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:13, или последовательность, приблизительно на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентичную SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:13, и/или вариательную область легкой цепи, описанную в SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14, или последовательность, приблизительно на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентичную последовательности SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14. В дополнительных вариантах реализации предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее вариательную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных замен, добавлений и/или делеций по сравнению с SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:13, и/или вариательную область легкой цепи, содержащую 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных замен по сравнению с SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14. Предпочтительно указанное антитело содержит замены, более предпочтительно - консервативные замены.

Кроме того, очевидно, что аминокислотные замены, добавления и/или делеций могут находиться в каркасных областях и/или в CDR.

В одном варианте реализации предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO:1, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO:2.

В одном варианте реализации предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO:13, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO:14.

В одном варианте реализации предложено полноразмерное антитело, содержащее последовательность тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:17, и последовательность легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:18.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфично связывающееся с CRTAM, причем указанное антитело содержит 3 CDR тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO:13 и 3 CDR легкой цепи согласно SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14, причем CDR соответствуют определению по Kabat или системе нумерации Chothia. Предпочтительно, указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфично связывающееся с CRTAM, содержит 3 CDR тяжелой цепи согласно SEQ ID NO:13 и 3 CDR легкой цепи согласно SEQ ID NO:14, соответствующие определению по Kabat или системе нумерации Chothia.

SEQ ID NO:13-18 представляют собой последовательности гуманизованных антител на основе последовательностей SEQ ID NO:1 и 2. Для специалиста в данной области техники понятно, что SEQ ID NO:17-18 представляют собой полноразмерные последовательности тяжелой и легкой цепей, включающие области, отличные от вариабельных областей, которые необходимы для получения полноразмерного функционального антитела, т.е. константные области и Fc-области. Для специалиста понятно, что последовательности гуманизируют путем замены аминокислот из вариабельной области организма, продуцирующего антитело, аминокислотами из последовательности зародышевой линии человека с целью минимизировать иммуногенные эффекты антител при их введении субъектам-людям. Большинство аминокислотных замен происходит в каркасной области, однако возможно замещение ряда аминокислот из CDR, находящихся в некритических положениях; такие замены по своей природе предпочтительно являются консервативными или приводят к обратному преобразованию аминокислоты в конкретном положении в аминокислоту, присутствующую в соответствующей зародышевой линии человека. В данном случае замещенные аминокислоты из CDR выявляли с использованием структурных моделей, позволяющих различать обращенные к паратопу и непаратопные остатки в области CDR. Это обеспечивает большую степень гуманизации антител по сравнению с обычной пересадкой CDR.

В настоящем изобретении SEQ ID NO:14 содержит 3 аминокислотных замены в CDR 1 (SEQ ID NO:15) по сравнению с CDR1 SEQ ID NO:2 (SEQ ID NO:8). В частности, имеет место замена V-S в положении 1 SEQ ID NO:8; замена E-V в положении 4 SEQ ID NO:8; и замена V-A в положении 10 SEQ ID NO:8. SEQ ID NO:14 дополнительно содержит 1 аминокислотную замену в CDR3 (SEQ ID NO:16) по сравнению с CDR3 из SEQ ID NO:2 (SEQ ID NO:10). В частности, имеет место замена S-A в положении 5 SEQ ID NO:10.

Для специалиста в данной области техники понятно, что данные гуманизованные последовательности не представляют собой различающиеся альтернативные антитела по сравнению с исходным антителом, но относятся к одному и тому же антителу, имеющему те же характеристики, которое всего лишь модифицировано с целью большего соответствия зародышевой линии человека с использованием структурного моделирования для минимизации иммуногенности.

В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает сродством связывания (K_D), равным 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ, 1 нМ или менее, в предпочтительном варианте сродство связывания составляет 0,75 нМ, 0,5 нМ или менее.

В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, конкурирующее за связывание с CRTAM с его лигандом necl2.

В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах реализации антитело представляет собой химерное, гуманизованное антитело или антитело человека. В некоторых вариантах реализации вариабельная область тяжелой цепи содержит каркасную последовательность. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере часть каркасной последовательности содержит консенсусную каркасную последовательность человека. В некоторых вариантах реализации вариабельная область легкой цепи содержит каркасную последовательность. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере часть каркасной последовательности содержит консенсусную каркасную последовательность человека.

В некоторых вариантах реализации антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fc-вариант, сконструированный для усиления связывания с FcγRIIa. В одном предпочтительном варианте реализации Fc-вариант включает аминокислотные замены S267E и/или L328F. В одном варианте реализации Fc представляет собой Fc-область IgG1. В дополнительном варианте реализации Fc пред-

ставляет собой Fc-область IgG4. В предпочтительном варианте реализации, если Fc-область представляет собой Fc-область IgG4, Fc-область дополнительно содержит замену S228P. В одном варианте реализации тяжелая цепь содержит последовательность, содержащую SEQ ID NO:17.

В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой сконструированное антитело или антигенсвязывающий фрагмент IgG1, полученное в условиях сайленсинга Fc и характеризующееся ослабленным связыванием или отсутствием связывания с одним или более Fc-рецепторами. В еще одном варианте реализации антитело представляет собой антитело IgG4.

В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой биспецифичное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, опосредующее цитотоксичность Т-клеток и/или цитотоксичность НК-клеток.

В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны индуцировать и/или усиливать активацию иммунной клетки. В одном варианте реализации иммунная клетка предпочтительно представляет собой Т-клетку. В еще одном варианте реализации иммунная клетка предпочтительно представляет собой НК-клетку. Для специалиста понятно, что термин "индукция" и/или "усиление" может относиться к индукции и/или усилению высвобождения цитокинов иммунной клеткой и/или индукции и/или усилению пролиферации указанных иммунных клеток и/или индукции и/или усилению цитотоксической активности. Для специалиста в данной области техники очевидно, что термин "индуцировать" или "индуцирующий" в настоящем контексте означает активацию иммунной клетки или усиление активации иммунной клетки до уровня, превышающего уровень активации, наблюдаемый в отсутствие антитела или антигена-связывающего фрагмента. Термин "усиление" в настоящем контексте относится к повышению уровня активации уже активированной иммунной клетки.

В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой биспецифичное или мультиспецифичное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, связывающееся с белком CRTAM и с одной или более дополнительными мишенями для связывания, причем указанные дополнительные мишени для связывания предпочтительно представляют собой один или более из опухолевых антигенов. В дополнительном варианте реализации указанные одна или более дополнительные мишени для связывания представляют собой иммуномодулирующие молекулы.

В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из: Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, Fv, scFv, dAb и однодоменного антитела.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложена одна или более из нуклеиновых кислот, кодирующих тяжелую цепь антитела согласно настоящему изобретению и/или легкую цепь антитела согласно настоящему изобретению. Следует понимать, что тяжелую и легкую цепи антитела согласно настоящему изобретению может кодировать одиночная молекула нуклеиновой кислоты или две отдельные молекулы нуклеиновой кислоты.

В еще одном аспекте предложены векторы, содержащие одну или более из нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложена клетка-хозяин, содержащая одну или более из нуклеиновых кислот, кодирующих тяжелую и/или легкую цепь антител согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации указанную клетку-хозяина выращивают в условиях, в которых происходит экспрессия нуклеиновых(ой) кислот(ы). В других вариантах реализации предложен способ выделения антитела согласно настоящему изобретению.

Аспекты настоящего изобретения включают способы получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, причем указанные способы включают культивирование клетки-хозяина в условиях, в которых происходит экспрессия антитела или антигенсвязывающего фрагмента в клетке-хозяине, и, необязательно, выделение антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

Аспекты настоящего изобретения включают фармацевтические композиции, содержащие антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель.

В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция или лекарственное средство дополнительно содержит эффективное количество второго терапевтического агента.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения расстройства, причем указанный способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению, связывающегося с CRTAM (SEQ ID NO:11). В одном варианте реализации указанное расстройство представляет собой рак.

В дополнительном аспекте предложен способ лечения рака, включающий введение эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в этом.

В одном варианте реализации антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, содержащую SEQ ID NO:5; CDR-H2, содержащую SEQ ID NO:6, и CDR-H3, содержащую SEQ ID NO:7, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, содержащую SEQ ID NO:8, или SEQ ID NO:15, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO:9, и CDR-L3,

содержащую SEQ ID NO:10 или SEQ ID NO:16. Варибельная область легкой цепи предпочтительно содержит CDR-1, содержащую SEQ ID NO:15, CDR-L2, содержащую SEQ ID NO:9, и CDR-L3, содержащую SEQ ID NO:16.

В некоторых вариантах реализации предложен способ лечения рака, при котором нуждающемуся в этом пациенту вводят антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению, и указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению индуцирует и/или усиливает иммунный ответ, например, цитотоксический Т-клеточный ответ и/или NK-клеточный ответ.

В некоторых вариантах реализации рак выбран из группы, состоящей из мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (включая плоскоклеточный рак и аденокарциномы), рака кожи, включая меланому, рака молочной железы (включая TNBC), рака ободочной и прямой кишки, рака желудка, рака яичника, рака шейки матки, рака предстательной железы, рака почки, рака печени, включая гепатоцеллюлярную карциному, рака поджелудочной железы, рака головы и шеи, рака носоглотки, рака пищевода, рака мочевого пузыря и других видов уроэпителиального рака, рака желудка, глиомы, глиобластомы, рака яичка, рака щитовидной железы, рака костей, рака желчного пузыря и желчных протоков, рака матки, рака надпочечников, саркомы, GIST, нейроэндокринных опухолей и гематологических злокачественных новообразований.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению для применения при профилактике или терапии.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент предпочтительно предназначены для применения при профилактике или терапии рака.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения предложено применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению при получении лекарственного средства для лечения рака.

В некоторых вариантах реализации рак в соответствии с предыдущими аспектами выбран из группы, состоящей из мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (включая плоскоклеточный рак и аденокарциномы), рака кожи, включая меланому, рака молочной железы (включая TNBC), рака ободочной и прямой кишки, рака желудка, рака яичника, рака шейки матки, рака предстательной железы, рака почки, рака печени, включая гепатоцеллюлярную карциному, рака поджелудочной железы, рака головы и шеи, рака носоглотки, рака пищевода, рака мочевого пузыря и других видов уроэпителиального рака, рака желудка, глиомы, глиобластомы, рака яичка, рака щитовидной железы, рака костей, рака желчного пузыря и желчных протоков, рака матки, рака надпочечников, саркомы, GIST, нейроэндокринных опухолей и гематологических злокачественных новообразований.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1a показана аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи исходного антитела 5A11 (SEQ ID NO:1).

На фиг. 1b показана аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи исходного антитела 5A11 (SEQ ID NO:2).

На фиг. 2a показана аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 5A11 (SEQ ID NO:13).

На фиг. 2b показана аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи гуманизированного антитела 5A11 (SEQ ID NO:14).

На фиг. 3 показано специфичное связывание антитела 5A11 и коммерчески доступного антитела против CRTAM CR24.1 с активированными Т-клетками в зависимости от дозы.

На фиг. 4 показано, что антитело 5A11 перекрестно реагирует с гомологом CRTAM яванского макака, а антитело CR24.1 - нет.

На фиг. 5 показана повышенная способность антитела 5A11 опосредовать продукцию ИФН- γ по сравнению с CR24.1 при активации Т-клеток.

На фиг. 6a показано выравнивание последовательности варибельной области тяжелой цепи последовательности исходного антитела 5A11 и последовательности варибельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела 5A11.

На фиг. 6b показано выравнивание последовательности варибельной области легкой цепи последовательности исходного антитела 5A11 и последовательности варибельной области легкой цепи гуманизированного антитела 5A11.

На фиг. 7 показано, что антитело 5A11 может активировать продукцию перфорина в Т-клетках *in vitro* в зависимости от дозы.

На фиг. 8 показано, что антитело 5A11 может активировать продукцию гранзима В в Т-клетках *in vitro* в зависимости от дозы.

На фиг. 9 показано, что антитело 5A11 может *in vitro* индуцировать цитотоксичность, опосредованную Т-клетками по отношению к опухолевым клеткам MCF7. На фиг. 10 показано, что антитело 5A11 может индуцировать продукцию гамма-интерферона в опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах (TIL),

выделенных из образцов первичных опухолей NSCLC, в анализах *ex vivo*. Этот анализ показывает, что антитело 5A11 обладает повышенной активностью по сравнению с коммерчески доступным антителом CR24.1.

На фиг. 11 показано, что антитело 5A11 может индуцировать продукцию гамма-интерферона в TIL, выделенные из образцов первичного рака молочной железы, в анализах *ex vivo*.

На фиг. 12 показано, что антитело 5A11 индуцирует продукцию гамма-интерферона в TIL в зависимости от дозы.

На фиг. 13 показано, что антитело 5A11 может вызывать NK-опосредованный лизис клеток K562.

На фиг. 14 показано, что антитело 5A11 может значительно снижать рост опухоли у мышей по сравнению с животными, получавшими контрольное изотипическое антитело.

Подробное описание изобретения

Аспекты настоящего изобретения включают антитела против CRTAM, нуклеиновые кислоты, кодирующие такие антитела, клетки-хозяева, содержащие такие нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело согласно настоящему изобретению, способы получения антител против CRTAM и способы лечения заболеваний, например, CRTAM-опосредованных расстройств, например, рака человека, включая мелко-клеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого (включая плоскоклеточный рак и аденокарциномы), рак кожи, включая меланому, рак молочной железы (включая TNBC), рак ободочной и прямой кишки, рак желудка, рак яичника, рак шейки матки, рак предстательной железы, рак почки, рак печени, включая гепатоцеллюлярную карциному, рак поджелудочной железы, рак головы и шеи, рак носоглотки, рак пищевода, рак мочевого пузыря и другие виды уроэпителиального рака, рак желудка, глиому, глиобластому, рак яичка, рак щитовидной железы, рак костей, рак желчного пузыря и желчных протоков, рак матки, рак надпочечников, саркомы, GIST, нейроэндокринные опухоли и гематологические злокачественные новообразования, но не ограничиваясь указанными.

Следует отметить, что в настоящем изобретении и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают формы множественного числа, если иное явным образом не следует из контекста. Кроме того, следует отметить, что при составлении формулы изобретения может быть исключен любой необязательный элемент. Подразумевается, что это утверждение как таковое используется в качестве основы антецедента для использования такой исключительной терминологии, как "исключительно", "только" и т.п. в связи с перечислением элементов формулы изобретения или использованием "отрицательного" ограничения.

Для специалистов в данной области техники после прочтения данного описания должно быть очевидно, что каждый из отдельных аспектов, описанных и проиллюстрированных в настоящем изобретении, содержит отдельные компоненты и признаки, которые можно отделять от или объединять с признаками любого из нескольких других аспектов без отступления от сущности настоящего изобретения. Любой изложенный способ можно выполнить в порядке перечисленных событий или в любом другом логически возможном порядке.

Определения

Для интерпретации настоящего описания используются следующие определения, причем термины, используемые в единственном числе, при необходимости также включают формы множественного числа и наоборот.

Термин "CRTAM" в настоящем изобретении относится к любому нативному белку CRTAM любого позвоночного, включая млекопитающих, например, приматов (например, людей, приматов и грызунов (например, мышей и крыс)), если не указано иное. Белок CRTAM также может называться CRTAM-подобным белком. Аминокислотная последовательность CRTAM человека представлена в настоящем изобретении в SEQ ID NO:11.

Термин "CRTAM" охватывает "полноразмерный" CRTAM, не подвергавшийся процессингу, а также любую форму CRTAM, образующуюся в результате процессинга в клетке. Данный термин также охватывает встречающиеся в природе варианты CRTAM, например, сплайс-варианты, аллельные варианты и изоформы. Термин, в частности, включает встречающиеся в природе укороченные или секретируемые формы полипептида CRTAM (например, последовательность внеклеточного домена). Полипептиды CRTAM, описанные в настоящем изобретении, можно выделить из множества источников, например, из различных тканей человека или из другого источника, или получить рекомбинантными или синтетическими способами. Определение "полипептид CRTAM с нативной последовательностью" включает полипептид с той же аминокислотной последовательностью, что и соответствующий полипептид CRTAM, полученный из природного источника. Такие полипептиды CRTAM с нативной последовательностью можно выделить из природных источников или получить рекомбинантными или синтетическими способами. В настоящем изобретении термин "эпитоп CRTAM" относится к эпитопу, связываемому антителом, содержащим по меньшей мере одну или более из последовательностей CDR, описанных в настоящем изобретении, и/или антителом, для которого типичным является профиль связывания антитела против CRTAM, показанный в разделе "Примеры".

Термин "антитело" используется в самом широком смысле и, конкретно, охватывает, например, одиночные моноклональные антитела против CRTAM (включая агонистические, антагонистические,

нейтрализующие антитела, полноразмерные или интактные моноклональные антитела), композиции антител против CRTAM с полиэпитопной специфичностью, поликлональные антитела, поливалентные антитела, мультиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела, при условии, что они проявляют желательную биологическую активность), образованные по меньшей мере из двух интактных антител, одноцепочечные антитела против CRTAM и антигенсвязывающие фрагменты антител против CRTAM, включая Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv-фрагменты, диатела, однодоменные антитела (sdAb) при условии, что они проявляют желательную биологическую или иммунологическую активность. Термин "иммуноглобулин" (Ig) в настоящем изобретении используется взаимозаменяемо с термином "антитело". Антитело может быть химерным, гуманизированным антителом, антителом человека и/или антителом, подвергнутым процедуре созревания сродства. Специалисты в данной области техники должны принимать во внимание, что в некоторых вариантах реализации минимальные антитела содержат набор из 6 CDR, определенных в настоящем изобретении; они включают традиционные антитела (включая как моноклональные, так и поликлональные антитела), гуманизированные антитела, антитела человека и/или химерные антитела, фрагменты антител, сконструированные антитела (например, с модификациями аминокислот, указанными ниже), мультиспецифичные антитела (включая биспецифичные антитела) и другие аналоги, известные в данной области техники и обсуждаемые в настоящем изобретении, но не ограничиваются указанными.

Следует понимать, что в других вариантах реализации термин "антитело", используемый в настоящем изобретении, относится к структурам, не содержащим 6 CDR; включая фрагменты Nanobody®, Unibody® и scFv, но не ограничиваясь указанными.

Термин "антитело против CRTAM", "антитело CRTAM" или "антитело, связывающееся с CRTAM" относится к антителу, способному связывать CRTAM с достаточным сродством, так что указанное антитело можно применять в качестве диагностического и/или терапевтического агента при адресном воздействии на CRTAM. В некоторых вариантах реализации антитело против CRTAM связывается с эпитопом CRTAM, который является консервативным среди CRTAM различных видов организмов.

"Выделенное антитело" представляет собой антитело, идентифицированное и отделенное и/или извлеченное из компонента его окружения. Загрязняющие компоненты окружения представляют собой материалы, мешающие терапевтическому применению антитела, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества.

По отношению к связыванию антитела с молекулой-мишенью термин "специфичное связывание" или "специфично связывается с" или "специфичен по отношению к" конкретного полипептида или эпитопа на конкретном полипептиде-мишени означает связывание, измеримо отличающееся от неспецифичного взаимодействия. Специфичное связывание можно измерить, например, путем определения связывания молекулы по сравнению со связыванием контрольной молекулы, которая обычно представляет собой молекулу со сходной структурой, не обладающую связывающей активностью.

Термин "антагонист" используется в самом широком смысле и включает любую молекулу, частично или полностью блокирующую, ингибирующую или нейтрализующую биологическую активность нативного полипептида CRTAM. Подходящие молекулы-антагонисты, в частности, включают антагонистические антитела или фрагменты антител, фрагменты или варианты аминокислотной последовательности нативных полипептидов CRTAM, пептиды, антисмысловые олигонуклеотиды, низкомолекулярные органические соединения и т.д. Способы выявления антагонистов полипептида CRTAM могут включать приведение полипептида CRTAM в контакт с молекулой-кандидатом в антагонисты и измерения обнаружимого изменения одной или более из биологических активностей, обычно ассоциированных с полипептидом CRTAM.

Термин "агонист" используется в самом широком смысле и включает любую молекулу, которая усиливает биологическую активность нативного полипептида CRTAM. Подходящие молекулы-агонисты, в частности, включают агонистические антитела или фрагменты антител, фрагменты или варианты аминокислотной последовательности полипептидов-лигандов CRTAM, пептиды, антисмысловые олигонуклеотиды, низкомолекулярные органические соединения и т.д. Способы выявления агонистов полипептида CRTAM могут включать приведение полипептида CRTAM в контакт с молекулой-кандидатом в агонисты и измерения обнаружимого изменения одной или более из биологических активностей, обычно ассоциированных с полипептидом CRTAM.

В настоящем изобретении "опухоль" относится ко всему росту и пролиферации опухолевых клеток, как злокачественных, так и доброкачественных, а также ко всем предраковым и раковым клеткам и тканям.

В настоящем изобретении термины "предсказуемый" и "прогностический" также являются взаимозаменяемыми в том смысле, что способы предсказания или прогнозирования должны позволять лицу, практикующему этот способ, выбирать пациентов, для которых реакция на лечение противораковым агентом, включая антитело против CRTAM, считается (как правило, до лечения, но не обязательно) более вероятной.

Белки CRTAM.

Согласно SWISS-PROT, CRTAM является мембранным белком типа I семейства нектинов. Белок состоит из одного Ig-подобного (иммуноглобулиноподобного) домена V-типа, одного Ig-подобного (иммуноглобулиноподобного) домена C-типа (Yeh et al., Cell. 2008 Mar 7; 132(5): 846-5), одной трансмембранной области и внеклеточного "хвоста" между аминокислотами 18 - 287 SEQ ID NO:11.

Его ген впервые выявили в активированных NKT-клетках мыши и человека (Kennedy et al., J Leukoc Biol. 2000 May; 67(5):725-34); последующие исследования показали, что его экспрессия строго регулируется активацией и ограничивается активированными клетками, ограниченными по MHC I класса, включая NKT и CD8 T-клетки (Patiño-Lopez et al., J Neuroimmunol. 2006 Feb; 171(1-2):145-55).

Единственным известным лигандом CRTAM является Necl2 (Galibert et al., J Biol Chem. 2005 Jun 10; 280(23):21955-64), и считается, что взаимодействие между лигандом и рецептором является предпочтительным по сравнению с гомофильными взаимодействиями любой из этих молекул. (Zhang et al., Structure. 2013 Aug 6; 21(8): 1430-9). Предполагается, что взаимодействие CRTAM-Necl2 способствует возникновению зрелого иммунного синапса и способствует стимуляции T-клеток непрофессиональными АПК. Эта функция также обнаружена в NK-клетках, где антитела к CRTAM стимулировали цитотоксичность NK-клеток (Boles et al., Blood. 2005 Aug 1; 106(3):779-86).

В некоторых вариантах реализации антитело согласно настоящему изобретению связывается с CRTAM человека. В настоящем изобретении термин "CRTAM человека" или "белок CRTAM человека" относится к белку с последовательностью SEQ ID NO:11, заданной в настоящем изобретении.

Антитело в соответствии с вариантами реализации настоящего изобретения в некоторых случаях может перекрестно реагировать с белком CRTAM животного, не являющегося человеком. Например, для облегчения доклинического и токсикологического тестирования антитело согласно настоящему изобретению может перекрестно реагировать с белками CRTAM мыши или примата. В качестве альтернативы, в определенных вариантах реализации антитело может быть специфичным по отношению к белку CRTAM человека и может не проявлять видовой перекрестной реакционной способности или перекрестной реакционной способности другого типа по отношению к белкам, не являющимися белками человека.

Антитела

Аспекты настоящего изобретения включают антитела против CRTAM, как правило, терапевтические и/или диагностические антитела, описанные в настоящем изобретении. Антитела, которые находят применение в способах согласно настоящему изобретению, могут представлять собой молекулы любого из ряда форматов, описанных в настоящем изобретении, включая традиционные антитела, а также производные антител, антигенсвязывающие фрагменты и миметики, дополнительно описанные в настоящем изобретении. В некоторых вариантах реализации антитело содержит одну или более CDR, выбранных из набора из 6 CDR, заданных в настоящем изобретении (включая небольшое количество аминокислотных замен, описанных в настоящем изобретении). Согласно вышеприведенному обзору, в настоящем изобретении термин "антитело" относится к различным структурам.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения применяют изотипы IgG. В одном варианте реализации применяют изотипические антитела IgG1, полученные в условиях сайленсинга Fc. В еще одном варианте реализации применяют изотипические антитела IgG4.

N-концевой фрагмент каждой цепи антитела включает переменную область длиной приблизительно от 100 до 110 или более аминокислот, в первую очередь ответственную за распознавание антигена. В переменной области для каждого из V-доменов тяжелой цепи и легкой цепи формируются три петли, образующие антигенсвязывающий сайт. Каждая из этих петель называется областью, определяющей комплементарность (далее называемой "CDR"), изменение аминокислотной последовательности которой является наиболее значимым. Термин "переменный" относится к тому факту, что последовательность определенных сегментов переменной области сильно различается у разных антител. Изменчивость в пределах переменной области распределена неравномерно. Напротив, V-области состоят из относительно инвариантных участков длиной 15-30 аминокислот, называемых каркасными областями (FR), разделенных более короткими крайне изменчивыми областями, называемыми "гиперпеременными областями", длина каждой из которых составляет 9-15 аминокислот или более.

Каждая из VH и VL состоит из трех гиперпеременных областей ("областей, определяющих комплементарность", "CDR") и четырех FR, расположенных от N-конца к C-концу в следующем порядке: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3 -FR4.

Гиперпеременная область обычно охватывает аминокислотные остатки приблизительно в диапазоне аминокислотных остатков 24-34 (CDR-L1; "L" обозначает легкую цепь), 50-56 (CDR-L2) и 89-97 (CDR-L3) в переменной области легкой цепи и приблизительно 31-35B (CDR-H1; "H" обозначает тяжелую цепь), 50-65 (CDR-H2) и 95-102 (CDR-H3) в переменной области тяжелой цепи; Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) и/или остатки, образующие гиперпеременную петлю (например, остатки 26-32 (CDR-L1), 50-52 (CDR-L2) и 91-96 (CDR-L3) в переменной области легкой цепи и 26-32 (CDR-H1), 53-55 (CDR-H2) и 96-101 (CDR-H3) в переменной области тяжелой цепи; Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917. Конкретные CDR согласно настоящему изобретению описаны ниже.

В настоящем описании систему нумерации по Kabat обычно используют для обозначения остатка в

вариабельном домене (приблизительно остатки 1-107 вариабельной области легкой цепи и остатки 1-113 вариабельной области тяжелой цепи) (например, Kabat et al., supra (1991)).

CDR вносят вклад в образование антиген-связывающего или, конкретнее, эпитоп-связывающего сайта антител. Один антиген может содержать более одного эпитопа.

Иммуноглобулины подкласса IgG содержат несколько иммуноглобулиновых доменов в тяжелой цепи. В настоящем документе изобретении нте под термином "иммуноглобулиновый (Ig) домен" подразумевается область иммуноглобулина, обладающая характерной третичной структурой. С точки зрения настоящего изобретения, интерес представляют домены тяжелых цепей, в том числе константные домены тяжелых цепей (CH) и шарнирные домены. В контексте антител IgG каждый из изотипов IgG содержит три CH-области.

Шарнирная область представляет собой Ig-домен другого типа. В настоящем изобретении под "шарниром" или "шарнирной областью" или "шарнирной областью антитела" или "шарнирной областью иммуноглобулина" подразумевается гибкий полипептид, содержащий аминокислоты между первым и вторым константными доменами антитела.

С точки зрения настоящего изобретения особый интерес представляют Fc-области. В настоящем изобретении под "Fc" или "Fc-областью" или "Fc-доменом" подразумевается полипептид, содержащий константную область антитела, за исключением первой константной области иммуноглобулинового домена и, в некоторых случаях, части шарнира. Таким образом, Fc относится к двум последним иммуноглобулиновым доменам константной области IgA, IgD и IgG, к последним трем иммуноглобулиновым доменам константной области IgE и IgM и гибкому шарниру, расположенному со стороны N-конца от этих доменов. Для IgA и IgM Fc может содержать J-цепь. Для IgG домен Fc содержит иммуноглобулиновые домены C γ 2 и C γ 3 (C γ 2 и C γ 3) и нижнюю область шарнира между C γ 1 (C γ 1) и C γ 2 (C γ 2). Хотя границы Fc-области могут варьироваться, Fc-область тяжелой цепи IgG человека, согласно определению, обычно содержит остатки с C226 или P230 до C-конца, где нумерация соответствует индексу ЕС, как в работе Kabat. В некоторых вариантах реализации в Fc-область вносят аминокислотные модификации, например, с целью изменения связывания с одним или более Fc γ R-рецепторами или с FcRn-рецептором. В некоторых вариантах реализации антитела являются полноразмерными. В настоящем изобретении под "полноразмерным антителом" подразумевается структура, составляющая природную биологическую форму антитела, включающую вариабельные и константные области, необязательно содержащие одну или более модификаций, описанных в настоящем изобретении.

В качестве альтернативы, антитела могут представлять собой различные структуры, в том числе антигенсвязывающие фрагменты, моноклональные антитела, биспецифичные антитела, мини-антитела, доменные антитела, синтетические антитела (иногда называемые в настоящем изобретении "миметиками антител"), химерные антитела, гуманизированные антитела, гибриды антител (иногда называемые "конъюгатами антител") и антигенсвязывающие фрагменты каждой из этих структур, соответственно, но не ограничиваются указанными. Структуры, основанные на использовании набора CDR, включены в определение "антитела".

В одном варианте реализации антитело представляет собой антигенсвязывающий фрагмент. Специфические антигенсвязывающие фрагменты антител включают (i) Fab-фрагмент, состоящий из VL, VH, CL и CH1-доменов, (ii) Fd-фрагмент, состоящий из VH и CH1-доменов, (iii) Fv-фрагмент, состоящий из VL и VH-доменов одного антитела; (iv) dAb-фрагмент (статья Ward et al., 1989, Nature 341:544-546, полностью включенная в настоящее изобретение посредством ссылки), состоящий из одной вариабельной области, (v) выделенные CDR-области, (vi) F(ab')₂-фрагменты - двухвалентный фрагмент, содержащий два связанных Fab-фрагмента, (vii) одноцепочечные молекулы Fv (scFv), в которых VH-домен и VL-домен связаны пептидным линкером, позволяющим двум доменам ассоциировать с образованием антигенсвязывающего сайта (статьи Bird et al, 1988, Science 242:423-426, Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-5883, полностью включенные в настоящее изобретение посредством ссылки), (viii) биспецифичный одноцепочечный Fv-фрагмент (WO 03/11161, включенный в настоящее изобретение посредством ссылки) и (ix) "диатела" или "триатела", мультиспецифичные или мультивалентные или мультиспецифичные фрагменты, сконструированные путем слияния генов, но не ограничиваются указанными (Tomlinson et al., 2000, Methods Enzymol. 326:461-479; WO 94/13804; Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448, все указанные источники полностью включены в настоящее изобретение посредством ссылок).

Химерные и гуманизированные антитела

В некоторых вариантах реализации антитело может представлять собой смесь фрагментов антител различных видов животных, например, химерное антитело и/или гуманизированное антитело. Т.е. в настоящем изобретении наборы CDR можно использовать с каркасными и константными областями, отличными от областей, конкретно описанных в последовательностях в настоящем изобретении.

В целом, как "химерные антитела", так и "гуманизированные антитела" относятся к антителам, в которых объединены области молекул более чем одного вида животных. Например, "химерные антитела" традиционно включают вариабельную область(и) мыши (или, в некоторых случаях, крысы) и кон-

стантную область(и) человека. "Гуманизированные антитела" обычно относятся к антителам нечеловеческого происхождения, в которых каркасные области переменного домена замещены последовательно, присутствующими в антителах человека. Как правило, в гуманизированном антителе все антитело, кроме CDR, кодируется полинуклеотидом человеческого происхождения или идентично такому антителу, за исключением его CDR. CDR, некоторые или все из которых кодируются нуклеиновыми кислотами, происходящими из организма животного, не являющегося человеком, пересаживают на каркас бета-листа переменной области антитела человека с целью создания антитела, специфичность которого определяется пересаженными CDR. Создание таких антител описано, например, в WO 92/11018, Jones, 1986, Nature 321:522-525, Verhoeven et al, 1988, Science 239:1534-1536; все указанные источники полностью включены в настоящее изобретение посредством ссылок. "В одном варианте реализации антитела согласно настоящему изобретению могут представлять собой полиспецифичные антитела, и, в частности, биспецифичные антитела, также иногда называемые "диателами". Они представляют собой антитела, связывающиеся с двумя (или более) различными антигенами или различными эпитопами на одном и том же антигене. Диатела можно получать различными способами, известными в данной области техники (статья Holliger and Winter, 1993, Current Opinion Biotechnol. 4:446-449, полностью включенная в настоящее изобретение посредством ссылки), например, получать химическим путем или из гибридом.

В одном варианте реализации изобретения антитело представляет собой миниантитело. Миниантитела представляют собой минимизированные антитело-подобные белки, содержащие scFv, присоединенный к CH3-домену. Hu et al., 1996, Cancer Res. 56:3055-3061, полностью включенная в настоящее изобретение посредством ссылки. В некоторых случаях scFv может быть присоединен к Fc-области и может полностью или частично включать шарнирную область. Следует отметить, что миниантитела включены в определение "антитело", несмотря на то, что они не содержат полного набора CDR.

Антитела согласно настоящему изобретению обычно являются выделенными или рекомбинантными.

В некоторых вариантах реализации антитела согласно настоящему изобретению представляют собой рекомбинантные белки, выделенные белки или по существу чистые белки. "Выделенному" белку не сопутствует по меньшей мере некоторый материал, с которым он обычно ассоциирован в своем естественном состоянии, например, он составляет по меньшей мере приблизительно 5 или по меньшей мере приблизительно 50 мас.% всего белка в данном образце. Следует понимать, что выделенный белок может составлять от 5 до 99,9 мас.% от общего содержания белка в зависимости от обстоятельств. Например, белок можно получать в значительно повышенной концентрации посредством использования индукционного промотора или промотора с высокой степенью экспрессии, позволяющего получать повышенные концентрации белка. В случае рекомбинантных белков данное определение включает получение антитела в широком разнообразии организмов и/или клеток-хозяев, известных в данной области техники, которые не продуцируют его в естественных условиях. Обычно выделенный полипептид получают с использованием по меньшей мере одной стадии очистки. "Выделенное антитело" относится к антителу, по существу не содержащему других антител, характеризующихся отличающейся специфичностью по отношению к антигену. Например, выделенное антитело, специфично связывающееся с CRTAM, по существу не содержит антител, специфично связывающих антигены, отличные от CRTAM.

Выделенные моноклональные антитела, характеризующиеся различной специфичностью, можно объединять в четко определенную композицию. Так, например, антитело согласно настоящему изобретению необязательно можно по отдельности включать в состав или исключать из него, как дополнительно обсуждается ниже.

Специфичное связывание с конкретным антигеном или эпитопом можно демонстрировать, например, с помощью антитела, характеризующегося K_D по отношению к антигену или эпитопу, равной по меньшей мере приблизительно 10^{-4} , по меньшей мере приблизительно 10^{-5} , по меньшей мере приблизительно 10^{-6} , по меньшей мере приблизительно 10^{-7} , по меньшей мере приблизительно 10^{-8} , по меньшей мере приблизительно 10^{-9} , в качестве альтернативы, по меньшей мере приблизительно 10^{-10} , по меньшей мере приблизительно 10^{-11} , по меньшей мере приблизительно 10^{-12} М или более, где K_D - скорость диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Как правило, антитело, специфично связывающее антиген, характеризуется K_D , 20-, 50-, 100-, 500-, 1000-, 5000-, 10000-кратно или в большее количество раз меньшим по отношению к антигену или эпитопу, чем к контрольной молекуле.

Кроме того, специфичное связывание с конкретным антигеном или эпитопом можно демонстрировать, например, с помощью антитела, характеризующегося K_A или K_a по отношению к антигену или эпитопу, по меньшей мере 20-, 50-, 100-, 500-, 1000-, 5000-, 10000-кратно или в большее количество раз большим по отношению к эпитопу, чем к контролю, где K_A или K_a - скорость ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

Стандартные анализы для оценки связывающей способности антител по отношению к CRTAM можно выполнять на уровне белка или клеток; такие анализы известны в данной области техники и включают, например, твердофазный ИФА, вестерн-блоттинг, РИА, анализы Octet®, Biacore® и проточного-цитометрический анализ. Подходящие анализы подробно описаны в разделе "Примеры". Кинетика связывания (например, средство связывания) антител также можно оценить с помощью стандартных

анализов, известных в данной области техники, например, Biacore® или системного анализа Octet®.

Антитела CRTAM.

В настоящем изобретении предложены антитела против CRTAM, связывающиеся с полипептидом CRTAM или его фрагментом. Пример аминокислотной последовательности CRTAM представлен в SEQ ID NO:11. Рассматриваемые антитела против CRTAM могут индуцировать или усиливать активацию иммунных клеток, например, активацию Т-клеток и/или активацию НК-клеток, усиливая иммунный ответ в опухоли. В настоящем изобретении данные антитела называются "антителами против CRTAM" или, для простоты описания, "CRTAM-антителами".

В некоторых вариантах реализации рассматриваемое антитело против CRTAM может индуцировать и/или усиливать высвобождение цитокинов или пролиферацию при контакте с Т-клетками, в частности, CD8+ Т-клетками, экспрессирующими CRTAM на своей поверхности. Высвобождение цитокинов или пролиферацию Т-клеток в данном контексте можно измерить несколькими способами. В одном варианте реализации антитело против CRTAM согласно настоящему изобретению приводят в контакт с активированными Т-клетками, используя стандартные анализы, например, твердофазный ИФА. В дополнительном варианте реализации антитело против CRTAM может индуцировать и/или усиливать активацию и цитотоксическую активность НК-клеток.

В одном варианте реализации антитело представляет собой антитело, содержащее следующие CDR; кроме того, как обсуждается ниже, эти последовательности CDR также могут содержать ограниченное количество вариантов аминокислот, как описано ранее:

CDR	SEQ ID NO:
5A11_VH_CDR1	SEQ ID NO:5
5A11_VH_CDR2	SEQ ID NO:6
5A11_VH_CDR3	SEQ ID NO:7
5A11_VL_CDR1	SEQ ID NO:15
5A11_VL_CDR2	SEQ ID NO:9
5A11_VL_CDR3	SEQ ID NO:16

В некоторых вариантах реализации антитело содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере одной или более последовательностей CDR, представленных в SEQ ID NO:5, 6, 7, 15, 9 и 16. В некоторых вариантах реализации антитело содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную аминокислотной последовательности одной или более последовательностей CDR, представленных в SEQ ID NO:5, 6, 7, 15, 9 и 16.

В настоящем изобретении также описаны переменные области тяжелых и легких цепей, составляющие наборы CDR согласно настоящему изобретению, а также полноразмерные тяжелые и легкие цепи (например, также содержащие константные области). Специалисты в данной области техники должны принимать во внимание, что наборы CDR согласно настоящему изобретению можно включать в константные области мыши, человека или гуманизированные области (включая каркасные области). Аспекты настоящего изобретения включают переменные области тяжелой цепи и переменные области легкой цепи, по меньшей мере приблизительно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичные последовательности переменной области тяжелой цепи (SEQ ID NO:13) и последовательности переменной области легкой цепи (SEQ ID NO:14), описанным в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложены антитела, связывающиеся с тем же эпитопом на CRTAM человека, что и моноклональное антитело CRTAM согласно настоящему изобретению, описанное в настоящем изобретении, или конкурирующие с ним (т.е. антитела, обладающие способностью к перекрестной конкуренции за связывание с белком CRTAM с моноклональным антителом согласно настоящему изобретению, описанным в настоящем изобретении). В некоторых вариантах реализации эталонное антитело для исследований перекрестной конкуренции может представлять собой антитело 5A11, описанное в настоящем изобретении. Такие перекрестно конкурирующие антитела можно выявлять на основании их способности перекрестно конкурировать с антителом 5A11. Следует понимать, что для того, чтобы антитело считалось перекрестно конкурирующим, оно не обязательно полностью блокирует связывание эталонного антитела. В некоторых вариантах реализации связывание эталонного антитела снижается по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99%.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложено антитело или его антиген-связывающий фрагмент, конкурирующее за связывание с CRTAM с лигандом psc12.

Модификации антитела

В настоящем изобретении дополнительно предложены варианты антитела, иногда называемые "производными антител" или "аналогами антител". Т.е. существует ряд модификаций, которые можно внести в антитела согласно настоящему изобретению, включая аминокислотные модификации в CDR

(созревание сродства), аминокислотные модификации в Fc-области, варианты гликозилирования и ковалентные модификации других типов (например, для присоединения конъюгатов лекарственных веществ и т.д.), но не ограничиваясь указанными.

Под "вариантом" подразумевают полипептидную последовательность, отличающуюся от последовательности исходного полипептида по меньшей мере одной аминокислотной модификацией. В некоторых вариантах реализации исходный полипептид представляет собой либо полноразмерную варируемую область тяжелой или легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO:1 или 2, 13 или 14, либо является одной или более последовательностями CDR, описанными в любой из SEQ ID NO:5-10, 15 или 16. В некоторых вариантах реализации аминокислотная модификация может включать замену, инсерцию и/или делецию, причем во многих случаях предпочтительна замена. В некоторых вариантах реализации замена может представлять собой консервативную замену.

В целом, варианты могут содержать любое количество модификаций при условии сохранения функции антитела, описанной в настоящем изобретении. Например, антитело должно по-прежнему специфично связываться с CRTAM человека. Аналогичным образом, при получении аминокислотных вариантов, например, в Fc-области, варианты антитела должны поддерживать требуемые функции связывания с рецептором для конкретного применения или показания указанного антитела.

"Варианты" рассматриваемых антител могут содержать аминокислотные модификации, описанные в настоящем изобретении, в одной или более из перечисленных последовательностей CDR, в одной или более из каркасных областей или в одной или более из константных областей (например, в Fc-области) антитела.

В некоторых вариантах реализации обычно используют 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций по сравнению с исходной последовательностью, так как часто целью является изменение функции при минимальном количестве модификаций. Некоторые варианты реализации содержат от 1 до 5 (1, 2, 3, 4 или 5) модификаций (например, отдельных аминокислотных замен, инсерций и/или делеций), причем во многих вариантах реализации также используют от 1 до 2, от 1 до 3 и от 1 до 4 модификаций. Например, в некоторых вариантах реализации одна или более последовательностей CDR антител согласно настоящему изобретению могут по отдельности содержать одну или более, например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных модификаций, предпочтительно 1-4, 1-3, 1 или 2 модификации. Как правило, в набор CDR вносят не более 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 изменений.

Следует отметить, что ряд модификаций аминокислот может находиться в пределах функциональных доменов: например, может быть желательным иметь 1-5 модификаций в Fc-области белка дикого типа или сконструированного белка, а также, например, от 1 до 5 модификаций в Fv-области. Последовательность вариантного полипептида предпочтительно обладает по меньшей мере приблизительно 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью по отношению к исходным последовательностям (например, последовательностям варируемых областей, последовательностям константных областей и/или последовательностям тяжелой и легкой цепи и/или CDR, например, антитела 5A11).

В настоящем изобретении под термином "аминокислотная замена" или "замена" подразумевают замену аминокислоты в конкретном положении исходной полипептидной последовательности другой аминокислотой. В настоящем изобретении под термином "инсерция аминокислоты" или "инсерция" подразумевают добавление аминокислоты в конкретное положение исходной полипептидной последовательности. В настоящем изобретении под термином "делеция аминокислоты" или "делеция" подразумевают удаление аминокислоты в конкретном положении исходной полипептидной последовательности.

В настоящем изобретении под термином "исходный полипептид", "исходный белок", "полипептид-предшественник" или "белок-предшественник" подразумевают немодифицированный полипептид, который впоследствии модифицируют, получая вариантный полипептид. Как правило, в настоящем изобретении "исходный полипептид" может относиться к полипептидам 5A11, например, V_H- или V_L-цепям или последовательностям CDR 5A11. Соответственно, в настоящем изобретении под "исходным антителом" подразумевают антитело, модифицированное с целью получения варианта антитела.

В настоящем изобретении под термином "дикий тип" или "д.т." или "нативный" подразумевают аминокислотную последовательность или нуклеотидную последовательность, встречающуюся в природе, включая их аллельные варианты. Белок, полипептид, антитело, иммуноглобулин, IgG и т.д. дикого типа содержит аминокислотную последовательность или нуклеотидную последовательность, не подвергавшуюся намеренным модификациям.

В настоящем изобретении под термином "вариантная Fc-область" подразумевают Fc-последовательность, отличающуюся от Fc-последовательности дикого типа за счет по меньшей мере одной аминокислотной модификации. Вариант Fc может относиться к самому полипептиду Fc, композициям, содержащим вариантный полипептид Fc, или к аминокислотной последовательности.

В некоторых вариантах реализации антитело против CRTAM согласно настоящему изобретению содержит вариантный Fc-домен. Как известно в данной области техники, Fc-область антитела взаимодействует с рядом Fc-рецепторов и лигандов, придавая антителу ряд важных функциональных свойств, называемых эффекторными функциями. В одно или более положений можно внести подходящие модификации и, в частности, специфические аминокислотные замены, снижающие или подавляющие связы-

вание с Fc-рецепторами.

В дополнение к описанным выше модификациям, можно внести и другие модификации. Например, молекулы можно стабилизировать путем включения дисульфидных мостиков, связывающих VH- и VL-домены (статья Reiter et al., 1996, Nature Biotech. 14:1239-1245, полностью включенная в настоящий документ посредством ссылки).

Кроме того, модификации по остаткам цистеина особенно полезны при применении конъюгатов "антитело-лекарственное средство" (ADC), дополнительно описанном ниже. В некоторых вариантах реализации константную область антител можно сконструировать так, чтобы она содержала один или более остатков цистеина, которые являются особенно "реакционноспособными по отношению к тиолам", с целью обеспечить более специфичное и контролируемое размещение лекарственного фрагмента. См., например, патент США № 7521541, полностью включенный в настоящее изобретение посредством ссылки. Кроме того, существует множество ковалентных модификаций антител, которые можно внести, как описано ниже.

Сущность настоящего изобретения включает ковалентные модификации антител, которые, как правило (но не всегда), осуществляются после трансляции. Например, ковалентные модификации антитела нескольких видов вносят в молекулу путем взаимодействия специфических аминокислотных остатков антитела с органическим модифицирующим агентом, который способен реагировать с выбранными боковыми цепями или N- или C-концевыми остатками.

Кроме того, специалисты в данной области техники должны понимать, что к антителам можно добавлять метки (в том числе флуоресцентные, ферментативные, магнитные, радиоактивные и т.д.), а также другие композиции согласно настоящему изобретению.

Биспецифичные молекулы.

В еще одном аспекте настоящее изобретение включает биспецифичные и мультиспецифичные молекулы, содержащие антитело против CRTAM или его фрагмент согласно настоящему изобретению. Антитело согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент можно модифицировать или связать с другой функциональной молекулой, например, другим пептидом или белком (например, другим антителом или лигандом рецептора) с целью получения биспецифичной молекулы, связывающейся с двумя различными сайтами связывания или молекулами-мишенями. В некоторых вариантах реализации антитело согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент можно модифицировать или связать по меньшей мере с двумя функциональными молекулами, например, другими пептидами или белками (например, другими антителами или лигандами рецептора) с целью получения мультиспецифичной молекулы, связывающейся по меньшей мере с тремя различными сайтами связывания или молекулами-мишенями. Для создания биспецифичной или мультиспецифичной молекулы согласно настоящему изобретению антитело согласно настоящему изобретению можно функционально связать (например, путем химического связывания, генетического объединения, нековалентной ассоциации или иным образом) с одной или более другими связывающими молекулами, например, другим антителом, фрагментом антитела пептид или миметиком связывания, получая биспецифичную или мультиспецифичную молекулу.

Соответственно, настоящее изобретение включает биспецифичные молекулы, содержащие по меньшей мере один первый специфичный связывающий фрагмент для первого эпитопа-мишени (т.е. CRTAM) и второй специфичный связывающий фрагмент для второго эпитопа-мишени. Второй эпитоп-мишень может присутствовать в том же белке-мишени, что и белок, связываемый первым специфичным связывающим фрагментом; или второй эпитоп-мишень может присутствовать в белке-мишени, отличном от белка, связываемого первым специфичным связывающим фрагментом. Второй эпитоп-мишень может присутствовать на той же клетке, что и первый эпитоп-мишень (т.е. CRTAM); или второй эпитоп-мишень может присутствовать на мишени, не экспонируемой клеткой, экспонирующей первый эпитоп-мишень. В настоящем изобретении термин "специфичный связывающий фрагмент" относится к фрагменту, содержащему по меньшей мере один переменный домен антитела.

В другом варианте реализации настоящего изобретения второй эпитоп-мишень присутствует на опухолевой клетке. Следовательно, аспекты настоящего изобретения включают биспецифичные молекулы, способные связываться как с CRTAM-экспрессирующими эффекторными клетками (например, CRTAM-экспрессирующими цитотоксическими Т-клетками), так и с опухолевыми клетками, экспрессирующими второй эпитоп-мишень.

В одном варианте реализации биспецифичное антитело согласно настоящему изобретению может содержать в общей сложности два или три переменных домена антитела, причем первый фрагмент биспецифичного антитела способен рекрутировать активность иммунной эффекторной клетки человека путем специфичного связывания с эффекторным антигеном, расположенным на иммунной эффекторной клетке человека, в которой эффекторным антигеном является CRTAM, причем указанный первый фрагмент состоит из одного переменного домена антитела, а второй фрагмент биспецифичного антитела способен специфично связываться с антигеном-мишенью, отличным от эффекторного антигена, причем указанный антиген-мишень расположен на клетке-мишени, отличной от указанной иммунной эффекторной клетки человека, и указанный второй фрагмент содержит один или два переменных домена анти-

тела.

В варианте реализации настоящего изобретения, в котором связывающий белок является мультиспецифичным, молекула может дополнительно содержать третий специфичный связывающий фрагмент в дополнение к противоопухолевому специфичному связывающему фрагменту и специфичному связывающему фрагменту против CRTAM. В одном варианте реализации третий специфичный связывающий фрагмент представляет собой фрагмент антагониста фактора усиления (EF), например, молекулу, связывающуюся с поверхностным белком, вовлеченным в цитотоксическую активность, и тем самым усиливающую иммунный ответ против клетки-мишени. "Фрагмент антагониста фактора усиления" может представлять собой антитело, функциональный фрагмент антитела или лиганд, связывающийся с данной молекулой, например, антигеном или рецептором, и тем самым приводящий к усилению эффекта детерминант связывания по отношению к антигену клетки-мишени. "Фрагмент антагониста фактора усиления" может связывать антиген клетки-мишени. В качестве альтернативы, фрагмент антагониста фактора усиления может связываться с объектом, отличающимся от объекта, с которым связываются первый и второй специфичные связывающие фрагменты. Например, фрагмент антагониста фактора усиления может связывать цитотоксическую Т-клетку (например, посредством CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 или другую иммунную клетку, что приводит к усиленному иммунному ответу против клетки-мишени).

В одном варианте реализации биспецифичный белок согласно настоящему изобретению содержит в качестве специфичного связывающего фрагмента по меньшей мере одно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включая, например, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fd, dAb или одноцепочечный Fv. Антитело также может представлять собой димер легкой цепи или тяжелой цепи или их любой минимальный фрагмент, например, Fv-фрагмент или одноцепочечный конструктор, описанный в патенте США № 4946778, содержание которого специально включено в настоящее изобретение посредством ссылки.

В некоторых вариантах реализации антитело, которое можно применять в биспецифичной молекуле согласно настоящему изобретению, представляет собой антитело мыши, человека, химерное или гуманизованное моноклональное антитело.

Связывание биспецифичных молекул с их конкретными мишенями можно подтвердить, например, с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (твердофазного ИФА), радиоиммуноанализа (РИА), анализа FACS, биологического анализа (например, ингибирования роста) или вестерн-блоттинга. При каждом из этих анализов обычно обнаруживает присутствие комплексов белок-антитело, представляющих особый интерес, с использованием меченого реагента (например, антитела), специфичного по отношению к исследуемому комплексу.

Гликозилирование

Еще одним видом ковалентной модификации являются изменения гликозилирования. Например, можно получить агликозилированное антитело (т.е. антитело, у которого отсутствует гликозилирование). Гликозилирование можно модифицировать, например, для увеличения сродства антитела к антигену. Такие модификации углеводов можно выполнить, например, путем модификации одного или более сайтов гликозилирования в последовательности антитела. Например, можно внести одну или более аминокислотных замен, ведущих к удалению одного или более сайтов гликозилирования в каркасе варибельной области, тем самым устраняя гликозилирование по этому сайту. Такое агликозилирование может увеличивать сродство антитела к антигену. Такой подход подробно описан со соавт. в патентах США № 5714350 и 6350861; его можно реализовать путем удаления аспарагина в положении 297.

Еще один вид ковалентной модификации антитела включает связывание антитела с различными небелковыми полимерами, включая различные полиолы, например, полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль или полиоксипалкены, но не ограничиваясь указанными, способом, изложенным, например, в 2005-2006 PEG Catalog от Nektar Therapeutics (доступен на веб-сайте Nektar), патентах США 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 или 4179337, полностью включенных в настоящий документ посредством ссылок. Кроме того, как известно в данной области техники, можно внести аминокислотные замены в различных положениях в составе антитела с целью облегчить добавление полимеров, например, ПЭГ. См., например, публикацию США № 2005/0114037A1, полностью включенную в настоящее изобретение посредством ссылки.

В дополнительных вариантах реализации, например, при применении антител согласно настоящему изобретению в целях диагностики или обнаружения, антитела могут содержать метку. В настоящем изобретении под термином "меченый" подразумевается, что соединение содержит по меньшей мере один фрагмент, элемент, изотоп или химическое соединение, присоединенное для обеспечения возможности обнаружения соединения, как описано в 6-м издании Molecular Probes Handbook, Richard P. Haugland, явным образом включенном в настоящее изобретение посредством ссылки.

Способы получения антител согласно настоящему изобретению

В настоящем изобретении также предложены способы получения описанных антител против CRTAM. Данные способы включают культивирование клетки-хозяина, содержащей выделенную(ые) нуклеиновую(ые) кислоту(ы), кодирующую(ие) антитело согласно настоящему изобретению. Специалисты в данной области техники должны понимать, что это можно сделать различными способами в зави-

симости от природы антитела. В некоторых вариантах реализации в случае, когда антитела согласно настоящему изобретению представляют собой полноразмерные традиционные антитела, например, клетку-хозяин, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую варируемую область тяжелой цепи и варируемую область легкой цепи, можно культивировать в условиях, обеспечивающих получение и возможность выделения антитела.

Вариабельные области тяжелой и легкой цепей антител согласно настоящему изобретению описаны в настоящем изобретении (как белковые, так и нуклеотидные последовательности); следует принимать во внимание, что в данной области техники их можно дополнить с целью получения полноразмерных тяжелых и легких цепей. Т.е. при наличии фрагментов ДНК, кодирующих сегменты V_H и V_L , описанные в настоящем изобретении, можно дополнительно манипулировать этими фрагментами ДНК с помощью стандартных методик рекомбинантных ДНК, например, для преобразования генов варируемой области в гены полноразмерных цепей антител, в гены Fab-фрагментов или в ген scFv. При этих манипуляциях фрагмент ДНК, кодирующий V_L или V_H , функционально связывают с другим фрагментом ДНК, кодирующим другой белок, например, константную область антитела или гибкий линкер. В данном контексте термин "функционально связанный" предназначен для обозначения соединения двух фрагментов ДНК с сохранением рамки считывания аминокислотных последовательностей, кодируемых этими двумя фрагментами ДНК.

Выделенную ДНК, кодирующую V_H -область, можно преобразовать в ген полноразмерной тяжелой цепи путем функционального связывания ДНК, кодирующей V_H , с другой молекулой ДНК, кодирующей константные области тяжелой цепи (C_H1 , C_H2 и C_H3). Последовательности генов константной области тяжелой цепи мыши известны в данной области техники (см., например, Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), и фрагменты ДНК, охватывающие эти области, можно получить с помощью стандартной ПЦР-амплификации. Константная область тяжелой цепи может представлять собой константную область IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM или IgD. В одном предпочтительном варианте реализации константная область тяжелой цепи представляет собой константную область IgG1 или IgG4. Для гена тяжелой цепи Fab-фрагмента ДНК, кодирующую V_H , можно функционально связать с другой молекулой ДНК, кодирующей только константную область тяжелой цепи C_H1 .

Выделенную ДНК, кодирующую V_L -область, можно преобразовать в ген полноразмерной легкой цепи (а также ген легкой цепи Fab) путем функционального связывания ДНК, кодирующей V_L , с другой молекулой ДНК, кодирующей константную область легкой цепи C_L . Последовательности генов константной области легкой цепи мыши известны в данной области техники (см., например, Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), и фрагменты ДНК, охватывающие эти области, можно получить с помощью стандартной ПЦР-амплификации. В одном предпочтительном варианте реализации константная область легкой цепи представляет собой константную область каппа или лямбда.

Для создания полинуклеотидной последовательности, кодирующей scFv-фрагмент антитела, фрагменты ДНК, кодирующие V_H и V_L , функционально связывают с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например, кодирующим аминокислотную последовательность $(Gly4-Ser)_3$, обеспечивая возможность экспрессии последовательностей V_H и V_L в виде непрерывного одноцепочечного белка, в котором области V_L и V_H соединены гибким линкером (см., например, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty et al., (1990) *Nature* 348:552-554).

Аспекты настоящего изобретения включают нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела согласно настоящему изобретению. Такие полинуклеотиды кодируют как вариабельные, так и константные области тяжелой и легкой цепей, хотя в настоящем изобретении также рассматриваются другие комбинации, соответствующие композициям, описанным в настоящем изобретении. Аспекты настоящего изобретения включают олигонуклеотидные фрагменты, происходящие от описанных полинуклеотидов и нуклеотидных последовательностей, комплементарных этим полинуклеотидам.

Полинуклеотиды в соответствии с вариантами реализации настоящего изобретения могут представлять собой или содержать РНК, ДНК, кДНК, геномную ДНК, аналоги нуклеиновых кислот и синтетическую ДНК. В некоторых вариантах реализации молекула ДНК может быть двуцепочечной или одноцепочечной, и в случае одноцепочечной молекулы она может представлять собой кодирующую (смысловую) или не кодирующую (антисмысловую) цепь. Кодирующая последовательность, которая кодирует полипептид, может быть идентична кодирующей последовательности, предложенная в настоящем изобретении, или может представлять собой другую кодирующую последовательность, которая в результате избыточности или вырожденности генетического кода кодирует те же полипептиды, что и ДНК, предложенная в данном изобретении.

В некоторых вариантах реализации нуклеиновую(ые) кислоту(ы), кодирующую(ие) антитела согласно настоящему изобретению, включают в экспрессирующие векторы, которые могут быть внехромосомными или сконструированными для интеграции в геном клетки-хозяина, в которую их вводят. Экспрессирующие векторы могут содержать любое количество соответствующих регуляторных последова-

тельностей (включая последовательности для контроля транскрипции и трансляции, промоторы, сайты связывания рибосом, энхансеры, сайты начала репликации и т.д., но не ограничиваясь указанными) или другие компоненты (селективные гены и т.д.), все из которых функционально связаны, как хорошо известно в данной области техники. В некоторых случаях используют две нуклеиновые кислоты, каждую из которых помещают в отдельный экспрессирующий вектор (например, тяжелую цепь - в первый экспрессирующий вектор, легкую цепь - во второй экспрессирующий вектор) или, в качестве альтернативы, их можно включать в один и то же экспрессирующий вектор. Специалисты в данной области техники должны понимать, что конструкция экспрессирующего(их) вектора(ов), включая выбор регуляторных последовательностей, может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина, желательный уровень экспрессии белка и т.д.

Обычно нуклеиновые кислоты и/или экспрессирующие векторы можно вводить в подходящую клетку-хозяина, получая рекомбинантную клетку-хозяина с применением любого способа, подходящего для выбранной клетки-хозяина (например, трансформации, трансфекции, электропорации, инфекции), функционально связывая молекула(ы) нуклеиновой кислоты с одним или более элементами контроля экспрессии (например, в векторе, в конструкторе, образованном за счет процессов в клетке, встроенной в геном клетки-хозяина). Полученную рекомбинантную клетку-хозяин можно поддерживать в условиях, подходящих для экспрессии (например, в присутствии индуктора, в организме подходящего животного, не являющегося человеком, в подходящих культуральных средах с добавлением соответствующих солей, факторов роста, антибиотиков, пищевыми добавок и т.д.), тем самым продуцируя кодируемый(е) полипептид(ы). В некоторых вариантах реализации тяжелую цепь и легкую цепь продуцирует одна и та же клетка-хозяин. В некоторых вариантах реализации тяжелую цепь продуцирует одна клетка-хозяин, а легкую цепь продуцирует другая клетка-хозяин.

Линии клеток млекопитающих, доступные в качестве хозяев для экспрессии, известны в данной области техники и включают множество иммортализованных линий клеток, доступных в Американской коллекции типовых культур (ATCC), Манассас, штат Виргиния, США, включая клетки яичника китайского хомяка (CHO), клетки HEK 293, клетки NSO, клетки HeLa, клетки почки детеныша хомяка (BHK), клетки почки обезьяны (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Нер G2) и ряд других клеточных линий, но не ограничиваясь указанными. Для экспрессии рекомбинантных антител также можно применять клетки, не являющиеся клетками млекопитающих, включая бактерии, дрожжи, клетки насекомых и растений, но не ограничиваясь указанными. В некоторых вариантах реализации антитела можно продуцировать в организме трансгенных животных, например, коров или кур.

Общие подходы в области молекулярной биологии, экспрессии, очистки и скрининга антител хорошо известны, например, см. патенты США № 4816567, 4816397, 6331415 и 7923211, а также *Antibody Engineering*, edited by Kontermann & Dubel, Springer, Heidelberg, 2001, 2010 Hayhurst & Georgiou, 2001, *Curr Opin Chem Biol* 5:683-689; Maynard & Georgiou, 2000, *Annu Rev Biomed Eng* 2:339-76; и Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202.

Фармацевтические композиции.

Аспекты настоящего изобретения включают композицию, например, фармацевтическую композицию, содержащую одно или более (или комбинацию) антител против CRTAM или их антигенсвязывающий(е) фрагмент(ы) согласно настоящему изобретению, включенную в состав вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Такие композиции могут включать одно антитело или комбинацию (например, двух или более различных) антител или биспецифичных молекул согласно настоящему изобретению. Например, фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может содержать комбинацию антител, связывающихся с различными эпитопами на антигене-мишени или обладающих взаимодополняющими активностями.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению также можно вводить в составе комбинированной терапии, т.е. в комбинации с другими агентами. Например, комбинированная терапия может включать антитело согласно настоящему изобретению в комбинации с по меньшей мере одним другим противоопухолевым агентом или противовоспалительным агентом или иммунодепрессантом. Примеры терапевтических агентов, которые можно применять в составе комбинированной терапии, подробно описаны ниже в разделе о применении антител согласно настоящему изобретению.

В настоящем изобретении термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает всевозможные растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие всасывание агенты и т.п. физиологически совместимые вещества. Носитель предпочтительно подходит для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или вливания). В зависимости от пути введения активное соединение, т.е. антитело или фрагмент антитела, можно покрыть материалом для защиты соединения от действия кислот и других природных условий, которые могут инактивировать данное соединение.

Фармацевтические соединения согласно настоящему изобретению могут включать одну или более из фармацевтически приемлемых солей. "Фармацевтически приемлемая соль" относится к соли, которая сохраняет желательную биологическую активность исходного соединения и не оказывает каких-либо

нежелательных токсикологических эффектов (см., например, Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19). Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению также может включать фармацевтически приемлемый антиоксидант. Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно применять в фармацевтических композициях согласно настоящему изобретению, включают воду, этанол, полиолы (например, глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси, растительные масла, например, оливковое масло и пригодные для инъекций органические сложные эфиры, например, этилолеат. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем использования материалов для покрытия, например, лецитина, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и путем использования поверхностно-активных веществ.

Данные композиции могут также содержать адьюванты, например, консерванты, увлажнители, эмульгаторы и диспергирующие агенты. Предотвращение наличия микроорганизмов можно обеспечить как за счет процедур стерилизации (см. выше), так и посредством включения различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабена, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и т.п. Кроме того, может быть желательно включение в композиции изотонических агентов, например, углеводов, хлорида натрия и т.п. Кроме того, продолжительное всасывание фармацевтической формы для инъекций можно обеспечить за счет включения агентов, замедляющих всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных растворов для инъекций или дисперсий. Использование таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в данной области техники. В фармацевтических композициях согласно настоящему изобретению предусмотрено применение обычных сред или агентов, за исключением случаев, когда они несовместимы с активным соединением. В композиции также можно включать дополнительные активные соединения.

Схемы введения корректируют с целью обеспечения оптимального желательного ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно выполнить одно болюсное введение, можно ввести несколько отдельных доз за определенное время, или можно пропорционально уменьшить или увеличить дозу согласно показаниям в зависимости от терапевтической ситуации. Особенно выгодно составлять парентеральные композиции в виде стандартной лекарственной формы для простоты и однородности введения. В настоящем изобретении стандартная лекарственная форма относится к физически дискретным единицам, подходящим для применения в качестве разовых доз у субъектов, подлежащих лечению; каждая лекарственная форма содержит заданное количество активного соединения, рассчитанное для получения желательного терапевтического эффекта, в комбинации с необходимым фармацевтическим носителем. Требуемые характеристики стандартных лекарственных форм согласно настоящему изобретению обусловлены и напрямую зависят от (а) уникальных характеристик активного соединения и конкретного достигаемого терапевтического эффекта, и (б) ограничений, присущих составлению композиций таких активных соединений для лечения чувствительности у индивидов.

При введении антитела дозировка может составлять от приблизительно 0,0001 до 100, от приблизительно 0,001 до 50, от приблизительно 0,001 до 10, от приблизительно 0,01 до 10 и более, обычно от 0,01 до 5 мг/кг массы тела хозяина. Например, дозировки могут составлять 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,75 мг/кг массы тела, 1, 3, 4, 5, 7,5 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела или в пределах диапазона 0,1-5 мг/кг или 1-10 мг/кг. Пример схемы лечения включает введение раз в день, через день, два раза в неделю, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели, один раз в месяц, один раз в 3 месяца или один раз в 3-6 месяцев. Предпочтительные схемы введения антитела против CRTAM согласно настоящему изобретению включают 1 мг/кг массы тела, 3, 5 или 10 мг/кг массы тела при внутривенном введении, причем антитело вводят с использованием одного из следующих графиков введения: (i) шесть доз - раз в неделю, затем каждый месяц; (ii) каждую неделю; (iii) разово 3 мг/кг массы тела, а затем 1 мг/кг массы тела раз в неделю.

В некоторых способах одновременно вводят два или более моноклональных антител с различной специфичностью связывания, и в этом случае дозировка каждого вводимого антитела должна соответствовать указанным диапазонам. В некоторых вариантах реализации антитело вводят многократно. Интервалы между разовыми дозами могут составлять, например, неделю, месяц, три месяца или год. Интервалы также могут быть нерегулярными, в соответствии с измерением уровня антител к антигену-мишени в крови пациента. В некоторых вариантах реализации дозировку регулируют до достижения концентрации антител в плазме приблизительно 1-1000 мкг/мл, а в некоторых способах - приблизительно 25-300 мкг/мл.

В некоторых вариантах реализации антитело можно вводить в виде состава с замедленным высвобождением, и в этом случае требуется менее частое введение. Дозировка и частота зависят от периода полувыведения антитела у пациента. В целом, самый длинный период полувыведения характерен для антител человека, следующими по этому показателю являются гуманизированные антитела, химерные антитела и антитела животных, не являющихся человеком. Дозировка и частота введения зависят от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. В профилактических целях вводят относительно низкие дозы через относительно большие интервалы в течение длительного периода времени.

Некоторые пациенты продолжают получать лечение до конца своей жизни. В терапевтических вариантах применения иногда требуется введение относительно высоких доз через относительно короткие интервалы вплоть до ослабления или прекращения прогрессирования заболевания и, предпочтительно, до частичного или полного улучшения симптомов заболевания у пациента. После этого пациенту можно вводить композицию согласно профилактической схеме.

Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях согласно настоящему изобретению можно варьировать с целью получения количества активного ингредиента, эффективного для достижения желательного терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения и не являющегося токсичным для пациента. Выбранный уровень дозировки зависит от множества фармакокинетических факторов, в том числе активности конкретных используемых композиций согласно настоящему изобретению или их сложных эфиров, солей или амидов, пути введения, времени введения, скорости выведения конкретного используемого соединения из организма, продолжительности лечения, других лекарственных веществ, соединений и/или материалов, используемых в комбинации с конкретными применяемыми композициями, возраста, пола, массы тела, медицинского состояния, общего состояния здоровья и предыдущего анамнеза пациента, подвергаемого лечению, и подобных факторов, хорошо известных в области медицины.

"Терапевтически эффективная дозировка" антитела против CRTAM согласно настоящему изобретению предпочтительно приводит к снижению выраженности симптомов заболевания, увеличению частоты и продолжительности периодов бессимптомного протекания заболевания или предотвращению инвалидности вследствие заболевания. Например, "терапевтически эффективная дозировка" предпочтительно ингибирует рост клеток или опухоли по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 20, по меньшей мере приблизительно на 30, более предпочтительно, по меньшей мере приблизительно на 40, по меньшей мере приблизительно на 50, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 60, по меньшей мере приблизительно на 70, и еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 80, по меньшей мере приблизительно на 90 или по меньшей мере приблизительно на 95% по сравнению с субъектами, не получавшими лечения. Способность соединения ингибировать рост опухоли можно оценить в животной модели, позволяющей прогнозировать эффективность при опухолях человека. В качестве альтернативы, это свойство композиции можно оценить путем оценки способности соединения ингибировать рост клеток, причем такое ингибирование можно измерить *in vitro* с помощью анализов, известных специалисту в данной области техники. Терапевтически эффективное количество терапевтического соединения может уменьшить размер опухоли или иным образом ослабить симптомы у субъекта. Специалист в данной области техники может определить такое количество на основе таких факторов, как размеры субъекта, тяжесть симптомов у субъекта и конкретная композиция или выбранный путь введения.

Композицию согласно настоящему изобретению можно вводить одним или более путями введения, используя один или более из множества способов, известных в данной области техники. Как должен принимать во внимание специалист в данной области техники, путь и/или способ введения зависит от желательных результатов. Предпочтительные пути введения антител согласно настоящему изобретению включают внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, внутривнутрибрюшинный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, путем инъекции или вливания. В настоящем изобретении фраза "парентеральное введение" означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включает, без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрикапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, интрадермальную, внутривнутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, внутрикожную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастеральную инъекцию и вливание.

В качестве альтернативы, антитело согласно настоящему изобретению можно вводить непарентеральным путем, например, местным, эпидермальным или мукозальным путем, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или наружно.

Можно получать активные соединения с носителями, которые защищают соединение от быстрого высвобождения, например, в виде состава с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, трансдермальные пластыри и микрокапсулированные системы доставки. Можно применять биоразлагаемые биосовместимые полимеры, например, этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевую кислоту, коллаген, полиортоэфиры и полимолочную кислоту. Многие способы получения таких составов запатентованы или общеизвестны специалистам в данной области (см., например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems* (1978) J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., N.Y).

В определенных вариантах реализации можно получить состав моноклонального антитела согласно настоящему изобретению для обеспечения надлежащего распределения *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) не пропускает многие соединения с высокой гидрофильностью. Для обеспечения прохождения терапевтических соединений согласно настоящему изобретению через ГЭБ (при желании) можно получить их состав, например, в липосомах. Способы получения липосом см., например, в патентах США 4522811; 5374548; и 5399331. Липосомы могут содержать один или более фрагментов

молекул, селективно транспортируемых в конкретные клетки или органы, что улучшает адресную доставку лекарственных средств (см., например, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Типичные фрагменты, обеспечивающие адресное воздействие, включают фолат или биотин (см., например, патент США 5416016); маннозиды (Umezawa et al. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); антитела (P.G. Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais et al. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); рецептор поверхностно-активного белка А (Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134); p120 (Schreier et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); см. также K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

Применение и способы

Антитела, композиции антител и способы по настоящему изобретению находят разнообразное диагностическое и терапевтическое применение *in vitro* и *in vivo*, включая диагностику и лечение иммуноопосредованных нарушений.

В некоторых вариантах реализации данные молекулы можно вводить в клетки в культуре, *in vitro* или *ex vivo*, или в организм субъектов-людей, например, *in vivo*, для лечения, профилактики и/или диагностики различных расстройств. В настоящем изобретении термин "субъект" предназначен для обозначения человека и животных, не являющихся человеком. Животные, не являющиеся человеком, включают всех позвоночных, например млекопитающих, например, приматов, не являющихся человеком, и животных, не являющихся млекопитающими. Предпочтительные субъекты включают субъектов-людей. При введении антител против CRTAM вместе с другим агентом антитела и агент можно вводить в любом порядке или одновременно.

Учитывая специфичное связывание антител согласно настоящему изобретению с CRTAM, антитела согласно настоящему изобретению можно применять для специфического выявления экспрессии CRTAM на поверхности иммунных клеток и, кроме того, для очистки CRTAM посредством иммуноаффинной очистки.

Кроме того, учитывая экспрессию CRTAM на иммунных клетках, антитела, композиции антител и способы согласно настоящему изобретению можно применять для лечения субъекта с онкогенным расстройством, например, расстройством, характеризующимся наличием опухолевых клеток, например, мелкоклеточным раком легких, немелкоклеточным раком легких (включая плоскоклеточные карциномы и аденокарциномы), раком кожи, включая меланому, раком молочной железы (включая TNBC), раком ободочной и прямой кишки, раком желудка, раком яичников, раком шейки матки, рак предстательной железы, раком почки, раком печени, включая гепатоцеллюлярную карциному, раком поджелудочной железы, раком головы и шеи, раком носоглотки, раком пищевода, раком мочевого пузыря и другими видами уроэпителиального рака, раком желудка, глиомой, глиобластомой, раком яичка, раком щитовидной железы, раком костей, раком желчного пузыря и желчных протоков, раком матки, раком надпочечников, саркомами, GIST, нейроэндокринными опухолями и гематологическими злокачественными новообразованиями.

В одном варианте реализации антитела согласно настоящему изобретению применяют для лечения рака, например, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (включая плоскоклеточный рак и аденокарциномы), рака кожи, включая меланому, рака молочной железы (включая TNBC), рака ободочной и прямой кишки, рака желудка, рака яичника, рака шейки матки, рака предстательной железы, рака почки, рака печени, включая гепатоцеллюлярную карциному, рака поджелудочной железы, рака головы и шеи, рака носоглотки, рака пищевода, рака мочевого пузыря и других видов уроэпителиального рака, рака желудка, глиомы, глиобластомы, рака яичка, рака щитовидной железы, рака костей, рака желчного пузыря и желчных протоков, рака матки, рака надпочечников, саркомы, GIST, нейроэндокринных опухолей и гематологических злокачественных новообразований.

В дополнительном варианте реализации антитела согласно настоящему изобретению применяют при получении лекарственного средства для лечения рака, например, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (включая плоскоклеточный рак и аденокарциномы), рака кожи, включая меланому, рака молочной железы (включая TNBC), рака ободочной и прямой кишки, рака желудка, рака яичника, рака шейки матки, рака предстательной железы, рака почки, рака печени, включая гепатоцеллюлярную карциному, рака поджелудочной железы, рака головы и шеи, рака носоглотки, рака пищевода, рака мочевого пузыря и других видов уроэпителиального рака, рака желудка, глиомы, глиобластомы, рака яичка, рака щитовидной железы, рака костей, рака желчного пузыря и желчных протоков, рака матки, рака надпочечников, саркомы, GIST, нейроэндокринных опухолей и гематологических злокачественных новообразований.

В одном варианте реализации антитела (например, моноклональные антитела, фрагменты антител, нанотела, мультиспецифичные и биспецифичные молекулы и композиции и т.д.) согласно настоящему изобретению можно применять для определения уровней CRTAM или уровней иммунных клеток, содержащих CRTAM на поверхности своей мембраны, уровни которых могут быть связаны с определенными симптомами заболевания, имеющими значение для диагностики.

В еще одном варианте реализации антитела (например, моноклональные антитела, мультиспецифичные и биспецифичные молекулы и композиции) согласно настоящему изобретению можно вначале

тестировать на предмет активности связывания, ассоциированной с терапевтическим или диагностическим применением *in vitro*. Например, композиции согласно настоящему изобретению можно тестировать с помощью проточной цитометрии, описанной в приведенных ниже примерах.

В некоторых вариантах реализации антитела (например, моноклональные антитела, мультиспецифичные и биспецифичные молекулы и композиции) согласно настоящему изобретению находят дополнительное применение в терапии и диагностике заболеваний. Например, моноклональные антитела, мультиспецифичные или биспецифичные молекулы можно применять для выявления *in vivo* или *in vitro* одной или более из следующих биологических активностей: для индукции и/или усиления активации иммунной клетки; опосредования фагоцитоза или ADCC клетки в присутствии эффекторных клеток человека, экспрессирующих CRTAM, или блокирования связывания лиганда CRTAM с CRTAM.

В конкретном варианте реализации антитела (например, моноклональные антитела, мультиспецифичные и биспецифичные молекулы и композиции) применяют *in vivo* для лечения, профилактики или диагностики различных заболеваний. Примеры соответствующих заболеваний включают, в числе прочего, ткани рака человека, представляющие мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого (включая плоскоклеточный рак и аденокарциному), рак кожи, включая меланому, рак молочной железы (включая TNBC), рак ободочной и прямой кишки, рак желудка, рак яичника, рак шейки матки, рак предстательной железы, рак почки, рак печени, включая гепатоцеллюлярную карциному, рак поджелудочной железы, рак головы и шеи, рак носоглотки, рак пищевода, рак мочевого пузыря и другие виды уротелиального рака, рак желудка, глиому, глиобластому, рак яичка, рак щитовидной железы, рак костей, рак желчного пузыря и желчных протоков, рак матки, рак надпочечников, саркому, GIST, нейроэндокринные опухоли и гематологические злокачественные новообразования.

Подходящие пути введения композиций антител (например, моноклональных антител, мультиспецифичных и биспецифичных молекул и композиций) согласно настоящему изобретению *in vivo* и *in vitro* хорошо известны в данной области техники и могут быть выбраны специалистами в данной области техники. Например, композиции антител можно вводить путем инъекции (например, внутривенной или подкожной). Подходящие дозы используемых молекул зависят от возраста и массы тела субъекта, а также от концентрации и/или состава композиции антител.

Как описано ранее, антитела против CRTAM-антитела согласно настоящему изобретению можно вводить совместно с одним или более дополнительными терапевтическими агентами, например, иммуностимулятором, цитотоксическим агентом, радиотоксическим агентом или иммунодепрессантом. Антитело можно связать с агентом (в составе иммунного комплекса) или вводить отдельно от агента. В последнем случае (раздельное введение) антитело можно вводить до, после или одновременно с агентом или применять совместно с другими известными терапевтическими средствами, например противораковым терапевтическим средством, например, лучевой терапией. Такие терапевтические агенты включают, в числе прочего, противоопухолевые агенты, например, доксорубин (адриамицин), цисплатин, сульфат флемоцидина, кармустин, хлорамбуцил, циклофосфамид и гидроксимочевина, которые сами по себе эффективны только в концентрациях, которые токсичны или субтоксичны для пациента. Другие агенты, подходящие для совместного введения с антителами согласно настоящему изобретению, включают другие агенты, применяемые для лечения рака, например, Avastin®, 5-ФУ и гемцитабин. Совместное введение антител против CRTAM или их антигенсвязывающих фрагментов согласно настоящему изобретению с химиотерапевтическими агентами обеспечивает присутствие двух противораковых агентов, действующих посредством различных механизмов и оказывающих цитотоксическое действие на опухолевые клетки человека. Такое совместное введение может решить проблемы из-за развития устойчивости к лекарственным средствам или изменения антигенности опухолевых клеток.

Кроме того, в качестве терапевтических агентов можно применять специфичные по отношению к мишени эффекторные клетки, например, эффекторные клетки, связанные с композициями (например, моноклональными антителами, мультиспецифичными и биспецифичными молекулами) согласно настоящему изобретению. Эффекторные клетки для адресного воздействия могут представлять собой лейкоциты человека, например, макрофаги, нейтрофилы или моноциты. Другие клетки включают эозинофилы, естественные киллеры и другие клетки, несущие рецептор IgG или IgA. При желании эффекторные клетки можно получить от субъекта, подлежащего лечению. Специфичные по отношению к мишени эффекторные клетки можно вводить в виде суспензии клеток в физиологически приемлемом растворе. Количество вводимых клеток может составлять порядка 10^8 - 10^9 , однако зависит от цели лечения.

Терапию с применением специфичных по отношению к мишени эффекторных клеток можно выполнять в сочетании с другими методиками. Например, противоопухолевую терапию с применением композиций (например, моноклональных антител, мультиспецифичных и биспецифичных молекул) согласно настоящему изобретению и/или эффекторных клеток в сочетании с этими композициями можно применять в сочетании с химиотерапией. Кроме того, комбинированную иммунотерапию можно применять для стимуляции отторжения опухолевых клеток с использованием двух различных популяций цитотоксических эффекторов.

Кроме того, биспецифичные и мультиспецифичные молекулы согласно настоящему изобретению

можно применять для модуляции FcγR или уровней FcγR на эффекторных клетках, например, путем блокирования и элиминации рецепторов на поверхности клетки. Кроме того, для этой цели можно применять смеси антител против Fc-рецепторов.

Аспекты настоящего изобретения включают наборы, содержащие композиции антител согласно настоящему изобретению (например, моноклональные антитела, биспецифичные или мультиспецифичные молекулы) и инструкции по их применению, например, при лечении рака. Набор может дополнительно содержать один или более из дополнительных реагентов, например, иммунодепрессант, цитотоксический агент или радиотоксический агент, или одно или более из дополнительных антител согласно настоящему изобретению (например, антитело, обладающее взаимодополняющей активностью и связывающееся с эпитопом антигена CRTAM, отличающимся от эпитопа для первого антитела).

Соответственно, пациентам, получающим лечение с применением композиций антител согласно настоящему изобретению, можно дополнительно вводить (до, одновременно или после введения антитела согласно настоящему изобретению) другой терапевтический агент, например, цитотоксический или радиотоксический агент, усиливающий или увеличивающий терапевтический эффект антител.

В других вариантах реализации субъект может дополнительно получать лечение с применением агента, модулирующего, например, усиливающего или ингибирующего экспрессию или активность Fcγ или рецепторов Fcγ, например, лечение субъекта с применением цитокина. Предпочтительные цитокины для введения во время лечения с применением мультиспецифичной молекулы включают гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (ГКСФ), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМКСФ), интерферон-γ (ИФН-γ) и фактор некроза опухолей (ФНО).

Композиции (например, антитела, мультиспецифичные и биспецифичные молекулы) согласно настоящему изобретению также можно применять для адресного воздействия на клетки, экспрессирующие FcγR или CRTAM, например, для мечения таких клеток. Для такого применения связывающий агент можно связать с молекулой, поддающейся обнаружению. Таким образом, в настоящем изобретении предложены способы локализации *ex vivo* или *in vitro* клеток, экспрессирующих Fc-рецепторы, например, FcγR или CRTAM. Обнаружимая метка может представлять собой, например, радиоактивный изотоп, флуоресцентное соединение, фермент или кофактор фермента.

В конкретном варианте реализации настоящего изобретения предложены способы обнаружения присутствия антигена CRTAM в образце или измерения количества антигена CRTAM, включающие приведение образца и контрольного образца в контакт с моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, специфично связывающимся с CRTAM, в условиях, допускающих образование комплекса между антителом или его фрагментом и CRTAM. Затем выполняют обнаружение образования комплекса, причем различие в образовании комплекса между образцом и контрольным образцом указывает на присутствие антигена CRTAM в образце.

В других вариантах реализации настоящего изобретения предложены способы лечения иммуноопосредованного расстройства у субъекта, например, злокачественных заболеваний человека, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (включая плоскоклеточный рак и аденокарциномы), рака кожи, включая меланому, рака молочной железы (включая TNBC), рака ободочной и прямой кишки, рака желудка, рака яичника, рака шейки матки, рака предстательной железы, рака почки, рака печени, включая гепатоцеллюлярную карциному, рака поджелудочной железы, рака головы и шеи, рака носоглотки, рака пищевода, рака мочевого пузыря и других видов уротелиального рака, рака желудка, глиомы, глиобластомы, рака яичка, рака щитовидной железы, рака костей, рака желчного пузыря и желчных протоков, рака матки, рака надпочечников, саркомы, GIST, нейроэндокринных опухолей и гематологических злокачественных новообразований.

Все источники, цитируемые в данном описании, включая, в числе прочего, все документы, публикации, патенты, заявки на патенты, презентации, тексты, отчеты, рукописи, брошюры, книги, публикации в Интернете, журнальные статьи, периодические издания, информационные бюллетени о продуктах и т.п., полностью включены в настоящее изобретение посредством ссылок. Обсуждение источников в настоящем изобретении предназначено исключительно для обобщения утверждений, сделанных их авторами; не следует допускать, что какой-либо источник представляет собой известный уровень техники, и заявители оставляют за собой право оспаривать точность и уместность цитируемых источников.

Хотя вышеизложенное изобретение подробно описано посредством иллюстраций и примеров в целях ясности понимания, специалисты в данной области техники в свете идей настоящего изобретения должны понимать, что в него можно внести некоторые изменения и модификации, не отступая от сущности или объема зависимых пунктов формулы изобретения.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не следует рассматривать как дополнительное ограничение. Следующие примеры, последовательности и фигуры представлены, чтобы облегчить понимание настоящего изобретения, истинная сущность которого изложена в прилагаемой формуле изобретения. Следует понимать, что в изложенные процедуры можно внести модификации без отклонения от сущности изобретения.

Примеры.

Пример 1. Получение и скрининг антител.

Получение гибридомы.

Моноклональные антитела крысы против CRTAM получали путем генетической иммунизации. CRTAM ECD (SEQ ID NO:12) использовали для создания плазмиды pB8-CRTAM-hum.ECD (Aldevron, Фрайбург) для иммунизации. Плазмиду pB8-CRTAM-hum.ECD использовали для иммунизации трех крыс. Спленциты иммунизированных крыс сливали с клетками линии миеломы, получая гибридомы, с использованием стандартных промышленных методов. Иммунизация крыс и тест титров.

Животных иммунизировали вектором (pB8-CRTAM-hum.ECD). Для выявления присутствия антител, специфичных к мишени ("титра антител"), в сыворотке иммунизированных животных выполняли анализ на основе проточной цитометрии (тест FACS).

Скрининг гибридом.

Для выявления сверхэкспрессирующих клеток гибридом использовали FACS-анализ. Сто восемь гибридомных клонов идентифицировали как положительные в ходе первичного скрининга.

Вторичный скрининг.

Рекомбинантный химерный белок hCRTAM/Fc (R&D Systems, номер в каталоге 1695-CR) наносили в количестве 100 нг/лунку на планшеты для анализа с высоким связыванием (№ в каталоге 12-565-136, Thermo Scientific) после разбавления 1X физиологическим раствором с фосфатным буфером по Дульбекко (DPBS) (№ в каталоге SH30028-03, Thermo Scientific). Планшеты трижды промывали промывочным буфером, 1X DPBS и 0,05% Tween 20 (№ в каталоге BP337-500, Fisher Scientific), используя устройство для промывки 96-луночных планшетов Tecan Hydro speed.

Планшеты с иммобилизованным антигеном блокировали раствором реагента для избыточной блокировки (доступного в Thermo Fisher) в течение 1 ч при комнатной температуре (КТ) после промывки.

В каждую лунку добавляли 100 мкл супернатанта гибридомы, разбавленного в соотношении 1:5 буфером для твердофазного ИФА (буфер для твердофазного ИФА, 1X DPBS, 0,05% Tween 20 и 1% бычий сывороточный альбумин, № в каталоге SH30574.02, Thermo Scientific). После инкубирования первичных антител планшеты трижды промывали промывочным буфером. Вторичное антитело, конъюгированное с ПХ (антитело козы против IgG крысы), разбавленное в соотношении 1:5000 буфером для твердофазного ИФА (специфичным по отношению к тяжелым и легким цепям, Jackson ImmunoResearch, номер в каталоге 112-035-167), добавляли в планшеты на час при комнатной температуре. Планшет трижды промывали в промывочном буфере. Реагент для 1-этапного ИФА Ultra TMB-ELISA (№ в каталоге 34028, Thermo Scientific) добавляли в каждую лунку для развития обнаружимого сигнала. После полного развития сигнала во все лунки добавляли 2 н. серную кислоту (№ в каталоге 8140-16, Ricca Chemical Company) для остановки реакции.

Оптическую плотность (OD) каждого образца определяли с использованием микропланшетного ридера VERSA max при длине волны 450 нм.

Пример 2. Исследование структурных характеристик моноклональных антител к CRTAM.

Последовательности кДНК, кодирующие вариабельные области тяжелой и легкой цепей моноклональных антител, получили с использованием стандартных методик ПЦР и секвенировали с использованием стандартных методик секвенирования ДНК. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей 5A11, отобранные в ходе скрининга, показаны на фиг. 1.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности вариабельной области тяжелой цепи 5A11 показаны в SEQ ID NO:3 и 1, соответственно.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности вариабельной области легкой цепи 5A11 показаны в SEQ ID NO:4 и 2, соответственно.

Дальнейший анализ последовательности VH 5A11 с использованием системы определения области CDR по Kabat привел к разграничению областей CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, показанных в SEQ ID NO:5, 6 и 7, соответственно. На фиг. 1a показаны последовательности VH 5A11 с CDR1, CDR2 и CDR3, заключенными в прямоугольники. Дальнейший анализ последовательности VL 5A11 с использованием системы определения области CDR по Kabat привел к разграничению областей CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, показанных в SEQ ID NO:8, 9 и 10, соответственно. На фиг. 1b показаны последовательности VL 5A11 с CDR1, CDR2 и CDR3, заключенными в прямоугольники.

Пример 3. Специфичность моноклональных антител к CRTAM при определении с использованием проточно-цитометрического анализа. Подготовка Т-клеток, активированных *in vitro*

Мононуклеарные клетки периферической крови (МПК) выделяли из лейкоцитарного слоя крови человека, как описано выше. 2Е6 МПК-клеток/мл культивировали в среде для культивирования Т-клеток (среда AIM V с 5% FBS, № в каталоге SH3008703, Fisher, Питтсбург, штат Пенсильвания, США) и 300 мкл ИЛ-2 (№ в каталоге 200-02, Reprotech, Роки-Хилл, штат Нью-Джерси, США) в присутствии 100 нг/мл антитела против CD3 (ОКТ3) в течение 4 дней. Затем клетки культивировали с гранулами для активации, содержащими антитело против СОЗ/антитело против CD28 (№ в каталоге 11132D, Thermo Fisher, Уолтем, штат Массачусетс, США) в течение 24 ч перед FACS-анализом (данные не показаны). Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА).

Анализ путем сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) выполняли в формате 96-

луночного планшета в соответствии со стандартными протоколами. Активированные Т-клетки получали, как указано выше. Все последующие этапы протокола окрашивания выполняли на льду с реагентами, охлажденными на льду, за исключением этапов центрифугирования, которые проводили при комнатной температуре. Трехкратные серийные разведения антител получали в буфере для FACS с целью построения 12-точечной кривой титрования с конечными концентрациями в диапазоне от 133 нМ до 1 пМ. Соответствующие супернатанты гибридом, изотипические контроли и антитела положительного контроля разбавляли буфером для FACS, охлажденным на льду, а затем тестировали в одной конечной концентрации 30 нМ. Каждое из разведений антител распределяли (100 мкл/лунку) в одну лунку для каждой линии клеток. Одну лунку оставляли неокрашенной в буфере для FACS. После 30 мин инкубирования с первичным антителом или контролем клетки дважды промывали путем добавления буфера для FACS с последующим центрифугированием в течение 5 мин при 1200 об/мин. Супернатант выбрасывали, а осадок клеток сохраняли. Вторичное антитело козы против IgG крысы (H+L)-RPE разбавляли до рабочей концентрации 1 мкг/мл и наносили во все лунки, кроме одной из лунок, не окрашенной первичным антителом. Вторичное антитело инкубировали с клетками в течение 30 мин. Клетки дважды промывали путем добавления буфера для FACS с последующим центрифугированием в течение 5 минут при 1200 об/мин. Конечные осадки клеток ресуспендировали в 150 мкл буфера для FACS + 50 мкл 4% параформальдегида и фиксировали до готовности для регистрации данных на проточном цитометре. Планшеты оставляли при 4°C до регистрации данных. Среднее геометрическое значение интенсивности флуоресценции (GMFI или геометрическое среднее) каждого образца определяли с помощью высокопроизводительного проточного цитометра Guava Easycyte Plus (96-луночные планшеты), необработанные данные анализировали с использованием программного модуля Guava Cytosoft Pro, версия 2.2.2 (Millipore, Биллерика, штат Массачусетс, США). График геометрического среднего строили в зависимости от концентрации антитела, используя программное обеспечение GraphPad™ Prism для выполнения нелинейной регрессии, анализа сигмоидальной зависимости "доза-ответ" и расчета EC50 для связывания антитела с активированными Т-клетками. На фиг. 3 показано специфичное связывание 5A11 с активированными Т-клетками в зависимости от дозы по сравнению с доступным для приобретения антителом CR24.1 против CRTAM (BioLegend). Как можно видеть, антитело 5A11 демонстрировало превосходное связывание с активированными Т-клетками.

Пример 4. Перекрестная реакционная способность антител против CRTAM. Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА).

Твердофазный иммуноферментный анализ (твердофазный ИФА) выполняли в формате 96-луночного планшета в соответствии со стандартными протоколами. На 96-луночный планшет для твердофазного ИФА (№ в каталоге 12-565-136, Thermo Scientific) в течение ночи при 4°C наносили 100 мкл 1 мкг/мл растворов белков HlgG1-Fc CRTAM яванского макака в 1X физиологическом растворе с фосфатным буфером по Дульбекко (DPBS) (№ в каталоге SH30028-03, Thermo Scientific). Планшет трижды промывали промыточным буфером, 1X DPBS и 0,05% Tween 20 (номер в каталоге BP337-500, Fisher Scientific), блокировали 250 мкл буфера для избыточной блокировки (номер в каталоге 37515, Thermo Scientific) в течение 30 мин при комнатной температуре, затем повторно трижды промывали промыточным буфером.

Антитела против CRTAM последовательно разбавляли в соотношении 1:3 буфером для твердофазного ИФА, 1X DPBS, 0,05% Tween 20 и 1% бычьего сывороточного альбумина (№ в каталоге SH30574.02, Thermo Scientific), получая 8-точечную кривую титрования с конечной концентрацией от 0,003 до 2 мкг/мл, и наносили в лунки в двух повторностях. Последнюю лунку оставляли в качестве холостой (с буфером для твердофазного ИФА). После 60 мин инкубирования с первичным антителом планшет трижды промывали в промыточном буфере.

Вторичное антитело козы против IgG крысы (H+L), конъюгированное с пероксидазой (AffiniPure), разбавляли в соотношении 1:5000 буфером для твердофазного ИФА и наносили в лунки с антителами против CRTAM и изотипическим контролем на 60 минут. F(ab')₂-фрагмент антитела козы против IgG мыши (H+L), конъюгированный с пероксидазой (AffiniPure), также разбавляли в соотношении 1:5000 буфером для твердофазного ИФА и наносили в лунки с CR24.1 на 60 мин.

Планшет трижды промывали в промыточном буфере. Реагент для 1-этапного ИФА Ultra TMB-ELISA (№ в каталоге 34028, Thermo Scientific) добавляли в каждую лунку для развития обнаружимого сигнала. После полного развития сигнала во все лунки добавляли 2 н. серную кислоту (№ в каталоге 8140-16, Ricca Chemical Company) для остановки реакции. Оптическую плотность (OD) каждого образца определяли с использованием микропланшетного ридера VERSA max при длине волны 450 нм. Поглощение для каждого образца усредняли по двум лункам, наносили на график зависимости от концентрации антител и рассчитывали EC50 с использованием нелинейной регрессии и анализа сигмоидальной зависимости "доза-ответ".

Обнаружено, что антитело 5A11 против CRTAM демонстрировало связывание с белком CRTAM яванского макака в зависимости от дозы, тогда как CR24.1 не связывалось с белком CRTAM яванского макака. На фиг. 4 показана перекрестная реакционная способность 5A11.

Пример 5. Способность антител против CRTAM активировать Т-клетки и стимулировать продукцию ИФН- γ .

Получение Т-клеток, активированных антителом против CRTAM и антителами против CD3 *in vitro*.

На 96-луночные планшеты, не предназначенные для культивирования тканей, наносили 2 мкг/мл ОКТ3 и различные концентрации антител/изотипов против CRTAM (при 11-кратном титровании от 20 мкг/мл с разбавлением в соотношении 1:2) при 4°C и инкубировали в течение ночи. Планшеты дважды промывали PBS с последующим блокированием AIMV с 5% FBS в течение 30 минут. После блокирования 0,1 млн. ОКТ3-праймированных Т-клеток (день 4), полученных в соответствии с описанием в примере 3, ресуспендировали в свежей среде AIMV и добавляли в планшеты. После однодневного инкубирования при 37°C супернатанты собирали и разбавляли для использования в твердофазном ИФА ИФН- γ .

Твердофазный иммуноферментный анализ (твердофазный ИФА) для определения ИФН- γ .

ИФН- γ измеряли с помощью соответствующего набора Ready-SET-Go! для твердофазного ИФА производства eBiosciences (№ в каталоге 50-173-24 Fischer Scientific). Следуя инструкциям производителя, на планшет с высокой степенью связывания (Corning 3690) наносили захватывающее антитело (разбавленное в соотношении 1:250 буфером для иммобилизации) в течение ночи при 4°C, затем трижды промывали промывочным буфером (PBS + 0,05% Tween-20). Планшет блокировали разбавителем для анализа в течение 1 ч на шейкере. Супернатант клеточной культуры добавляли в планшеты при соответствующем разбавлении (1:400 для ИФН- γ) и инкубировали в течение 2 часов на шейкере с последующей 3-кратной промывкой. Добавляли биотинилированные детектирующие антитела (представленные в наборе), разбавленные в соотношении 1:250 разбавителем для анализа, и инкубировали в течение 1 ч на планшетном шейкере. Планшет промывали промывочным буфером и добавляли стрептавидин, конъюгированный с ПХ (представленный в наборе), разбавленный в соотношении 1:1000 разбавителем для анализа. После 30 минут инкубирования на планшетном шейкере планшет промывали и добавляли раствор субстрата TMB (представленный в наборе). Развитие реакции останавливали приблизительно через 5-10 мин добавлением 2 н. раствора H₂SO₄, и считывали поглощение на планшет-ридере при 450 нм (OD450).

Результаты.

Антитело 5A11 проявляло повышенную активность в предварительно активированных ОКТ3 Т-клетках, что отражалось в увеличенной продукции ИФН- γ по сравнению с антителом CR24.1 (Фиг. 5). Это показывает, что антитела против CRTAM должны оказывать терапевтический эффект у пациентов с ингибированной иммунной системой.

Пример 6. Гуманизация антитела 5A11.

Моноклональное антитело 5A11 крысы гуманизовали с использованием технологии пересадки CDR. Для управления процессом гуманизации и облегчения принятия решения о сохранении исходных остатков антитела крысы или их замены аналогами зародышевой линии человека построили гомологичную молекулярную модель Fv-фрагмента моноклонального антитела крысы 5A11.

Определение CDR основано на номенклатуре Кабата. Отбор акцепторных каркасных областей человека, на которые следует пересадить CDR-области антитела 5A11 крысы, осуществляли путем поиска V-генов крысы и человека в базе данных IMGT с использованием программного обеспечения IgBLAST, разработанного в NCBI для облегчения анализа последовательностей V-областей иммуноглобулинов, используя последовательности варибельной области антитела 5A11 крысы в качестве входных данных. Применяемая стратегия заключалась в использовании последовательностей зародышевой линии человека, представляющих собой природные последовательности человека, не содержащие специфических соматических мутаций, обнаруженных в отдельных последовательностях антител человека.

Гомологичная молекулярная модель антитела 5A11 крысы.

Методология построения гомологичной модели.

Модель антитела BUN-5A11-F2 ('5A11') сконструировали в соответствии с установленными протоколами (Ramos OHP. Computer-assisted modeling of antibody variable domains. *Methods Mol Biol* 2012; 907: 39-55). Последовательности варибельных областей тяжелой (VH) и легкой (VL) цепи отдельно пронумеровали/аннотировали в соответствии с соглашением IMGT с целью разделения каркасных последовательностей и последовательностей CDR.

Каркасные остатки VL использовали для поиска последовательностей разрешенных структур антител с помощью BLAST для белков. Наилучшее совпадение для VL обеспечивала структура 4AIZ (разрешение 1,75 Å) (65 из 108 идентичных остатков). Ее выбрали в качестве матрицы, однако для исправления конформации N-концевого серина, отсутствующего в 4AIZ, использовали совпадение с незначительно более низким рейтингом, обеспечиваемое для VL структурой 3G6D (разрешение 3,20 Å, 64 из 107 идентичных остатков). Последовательность CDR2 VL была идентична последовательности 4AIZ; таким образом, необходимость в поиске матрицы CDR2 отсутствовала. Последовательности CDR1 и CDR3 VL с добавлением двух остатков на каждом конце использовали для поиска последовательностей разрешенных структур антител с помощью BLAST для белков. Наилучшее совпадение для CDR3 VL обеспечивала структура 1NFD (разрешение 2,80 Å, 11 из 15 идентичных остатков). Ни одна структура антител мыши или крысы не соответствовала последовательности CDR1 с добавлением двух остатков на каждом конце;

поиск структур антител мыши или крысы с каркасом VL также не дал совпадений с хорошим приближением. Наилучшее совпадение для CDR1 при поиске по структурам человека обеспечивала переменная ламбда-область человека в 4AIZ (5 из 10 идентичных остатков), которую использовали в качестве матрицы VL. Программное обеспечение PyMol (Молекулярная графическая система PyMOL, версия 1.3r1, Schrodinger, LLC.) использовали для подгонки матрицы CDR3 к матрице каркасной области с использованием двух липких концов для присоединения фрагмента матрицы CDR к матрице каркасной области VL. Собранную частичную модель VL вручную подвергали мутагенезу (в PyMol), отбирая оптимальные ротамеры, соответствующие последовательности VL 5A11.

Каркасные остатки VH использовали для поиска последовательностей разрешенных структур антител с помощью BLAST для белков. Наилучшее совпадение обеспечивали VH-структуры антитела 5AUM крысы (разрешение 2,05 Å, 85 из 116 идентичных остатков); это антитело относится к той же зародышевой линии IGHV10-5, что и 5A11, и поэтому его выбрали в качестве матрицы. Последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 VH с добавлением двух остатков на каждом конце использовали для поиска последовательностей разрешенных структур антител с помощью BLAST для белков. Наилучшее совпадение для CDR1 VH обеспечивала структура 4HPY (разрешение 1,50 Å, 9 из 11 идентичных остатков). Наилучшее совпадение для CDR2 VH обеспечивала структура 5AUM (11 из 14 идентичных остатков). Наилучшее совпадение для VH CDR3, 1Q72, не выбрали в качестве матрицы из-за наличия 4 пропусков при выравнивании; вместо него выбрали структуру 4BZ1, обеспечивавшую совпадение с более низким рейтингом (разрешение 1,50 Å, 7 из 14 идентичных остатков); причиной этого было то, что перекрывание фрагментов CDR3 1Q72 и 4BZ1 показывает, что N- и C-концевые участки хорошо соответствовали матрице каркасной области и друг другу, в то время как 4BZ1 обеспечивала удовлетворительное закрытие инсерции последовательности, обнаруженной в 1Q72. Матрицы CDR подгоняли к матрице каркаса (в PyMol) с использованием двух липких концов для присоединения каждого фрагмента матрицы CDR к матрице каркасной области. Наконец, собранную частичную модель VH вручную подвергали мутагенезу (в PyMol), отбирая оптимальные ротамеры, соответствующие последовательности VH 5A11. Затем выбрали наилучшее расположение частичных моделей VH и VL в третичной структуре для сборки окончательной модели. Последовательности матриц VH и VL отправили на сервер PAPS (сервер прогнозирования углов упаковки - Abhinandan KR, Martin ACR Analysis and prediction of vh/vl packing in antibodies. Protein Eng Des Sel 2010; 23: 689-697) для поиска оптимальной прогнозируемой третичной структуры. Сервер PAPS дал прогноз, что разрешенная структура антитела 1D5B с относительным углом упаковки - 44,5 градуса обеспечит наилучшее расположение VH и VL в третичной структуре. Таким образом, собрали окончательную модель путем подгонки координат сохраненных опорных сегментов скелета (остатки 41-44 и 101-104) частичных моделей VH и VL к 1D5B (в PyMol). Наконец, координаты этой окончательной модели подвергли циклу расчетов для минимизации энергии с использованием GROMACS (Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJC. Gromacs: fast, flexible, and free. J Comput Chem 2005; 26: 1701-1718) с силовым полем GROMOS96 (Scott WRP, Hunenberger PH, Tironi IG, Mark AE, Billeter SR, Fennen J, Torda AE, Huber T, Kruger P, van Gunsteren WF. The gromos biomolecular simulation program package. J Phys Chem A 1999; 103: 3596-3607).

Конструирование тяжелой цепи.

Отличия аминокислотной последовательности от наиболее гомологичной зародышевой линии крысы IGHV10-5*01.

Аминокислотная последовательность VH, выделенной из гибридомы 5A11 крысы (области CDR согласно схеме нумерации по Kabat выделены жирным шрифтом).

```

FR1                CDR1    FR2    CDR2
AVQLVESGGGLVQPKESLKISCAASGFTFSDAAMYWVRQAPGKLEWVARIRTKTNN
YAAN
                FR3                CDR3 FR4
YVESVKGRFTVSRDDSKSMVYLQMDNLKTDDTAMYYCTSVPQGTQDYWGQGMVT
VSS

```

91% идентичность (91 идентичный остаток из в общей сложности 100 аминокислот) между переменной областью тяжелой цепи 5A11 крысы и иммуноглобулином зародышевой линии VH 10-5*01 (IGHV10-5*01) крысы.

```

<-----FR1-----><CDR><----FR2---->
5A11 VH   1 AVQLVESGGGLVQPKESLKISCAASGFTFSDAAMYWVRQAPGKLEWVA 49
IGHV10-5*01 1 .....N..... 49
                <-----CDR2-----><-----FR3----->
5A11 VH 50 RIRTKTNNYAANYVESVKGRFTVSRDDSKSMVYLQMDNLKTDDTAMYYCTS 100
IGHV10-5*01 50 ....P...TY.AD.....I.....E.....A 100

```

Отбор акцепторных каркасных VH-областей человека.

Отбор акцепторных каркасных VH-областей человека, на которые пересаживали CDR-области антитела 5A11 крысы, осуществляли путем поиска генов VH человека в базе данных IMGT с помощью Ig-

BLAST, используя аминокислотную последовательность VH-области крысы в качестве входных данных. На основании выравнивания последовательностей исходного антитела и зародышевых линий человека выявили наиболее совпадающие записи. Выявление оптимальной для использования в качестве акцептора зародышевой линии человека выполняли на основании следующих упорядоченных критериев: идентичности последовательности по рамке считывания в соответствии с нумерацией Kabat и идентичности и/или совместимости остатков межцепочечной области взаимодействия и поддерживающих петель с каноническими конформациями исходных CDR. При этом анализе оказалось, что зародышевая линия IGHV3-73*01 человека является лучшим вариантом для использования в качестве акцепторных каркасных областей человека, обеспечивающим общий процент идентичности, равный 75% (75 остатков из 100). Таким образом, эту зародышевую линию человека использовали для конструирования гуманизированной версии. Ген J2 зародышевой линии крысы (IGHJ2*01) идентифицировали как ген сегмента, наиболее гомологичный соответствующему гену J VH антитела 5A11 крысы. Последовательность FR4 VH 5A11 идентична последовательности гена зародышевой линии IGHJ2*01 крысы. Ген J2-сегмента крысы сравнивали с генами J-сегмента человека по CDR3 и FR4 и выполнили отбор J-сегмента человека IGHJ4 (IGHJ4*01).

Конструирование с использованием зародышевой линии человека IGHV3-73*01 в качестве акцепторных каркасных областей.

Гуманизированная версия A.

CDR крысы (выделен полужирным шрифтом), определенный в соответствии с номенклатурой Kabat, пересадили на IGHV3-73*01, получив последовательность, подробно описанную ниже. Подчеркнутые остатки представляют собой каркасные остатки крысы (за пределами остатков CDR), т.е. сохраненные остатки исходной VH-последовательности антитела 5A11 крысы; их сохранили, поскольку они могут быть структурно важны для поддержания полноценной активности антитела.

Версия A.

```

FR1                CDR1    FR2
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSDAAMYWVRQASGKGLEWVA
CDR2                FR3
RIRTKTNNYAAHYVESVKGRFTVSRDDSKNTVYQLMNSLKTEDTAMYYCTS

```

85% идентичность (85/100) гуманизированной версии A и зародышевой линии человека. IGHV3-73*01

```

<-----FR1-----><CDR><----FR2---->
5A11-373-VHA 1 EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSDAAMYWVRQASGKGLEWVA 49
IGHV3-73*01 1 .....GS..H.....G 49
<----CDR2-----><-----FR3----->
5A11-373-VHA 50 RIRTKTNNYAAHYVESVKGRFTVSRDDSKNTVYQLMNSLKTEDTAMYYCTS 100
IGHV3-73*01 50 ...S.A.S.TA.AA.....I.....A.....V....R 100

```

В каркасной области 2 (FR2) остаток H49 Ala в соответствии с нумерацией по Kabat известен как "остаток Вернье", он соседствует с VH-CDR2 и может влиять на конформацию CDR и тонкую настройку распознавания антигена. В каркасной области 3 (FR3) остатки H69 Val и H78 Val в соответствии с нумерацией по Kabat известны как "остатки Вернье". Они соседствуют с CDR и могут влиять на конформацию CDR и тонкую настройку распознавания антигена.

Конструирование легкой цепи.

Отличия аминокислотной последовательности от наиболее гомологичной зародышевой линии крысы IGLV4-S1*01.

Аминокислотная последовательность VL антитела 5A11 крысы (выделены области CDR).

```

FR1                CDR1    FR2
SYELIQPPASVTLGNTVSLTCVGDELSKRYVQWSQQKPKDKTIVSVIY
CDR2                FR3                CDR3    FR4
KDSERPSGISDRFSGSSGTTATLTINGTLAEDEADYYCLSTYSDDNLPFVGGGKTLTVL

```

97,9% (94/96) идентичность (94 идентичных остатка из в общей сложности 96 аминокислот) между VL антитела 5A11 крысы и вариабельной лямбда-областью иммуноглобулина зародышевой линии крысы IGLV4-S1*01.

```

<-----FR1-----><--CDR1--><----FR2---->
5A11 VL  1 SYELIQPPASVTLGNTVSLTCVGDELSKRYVQWSQQKPKDKTIVSVIY 48
IGLV4-S1*01 1 .....A..Y..... 48
<CDR2--><-----FR3-----><--CDR3-->
5A11 VL  49 KDSERPSGISDRFSGSSGTTATLTINGTLAEDEADYYCLSTYSDDNL 96
IGLV4-S1*01 49 ..... 96

```

Отбор акцепторных каркасных VL-областей человека.

Отбор акцепторных каркасных VL-областей человека, на которые пересаживали CDR-области антитела 5A11 крысы, осуществляли путем поиска генов VL человека в базе данных IMGT с помощью Ig-BLAST, используя аминокислотную последовательность VL-области крысы в качестве входных данных. На основании выравнивания последовательностей исходного антитела и зародышевых линий человека выявили наиболее совпадающие записи. Выявление оптимальной для использования в качестве акцептора зародышевой линии человека выполняли на основании следующих упорядоченных критериев: идентичности последовательности по рамке считывания в соответствии с нумерацией Kabat и идентичности и/или совместимости остатков межцепочечной области взаимодействия и поддерживающих петель с каноническими конформациями исходных CDR. При этом анализе оказалось, что зародышевая линия IGLV3-27*01 человека является лучшим вариантом для использования в качестве акцепторных каркасных областей человека, обеспечивающим общий процент идентичности, равный 64,6% (62 аминокислотных остатка из 96). Таким образом, эту зародышевую линию человека использовали для конструирования гуманизированных версий.

Ген J1 зародышевой линии крысы (IGKJ1*01) идентифицировали как ген сегмента, наиболее гомологичный соответствующему гену J VL антитела 5A11 крысы. Ген J1-сегмента крысы сравнивали с генами J-сегмента человека по CDR3 и FR4 и выполнили отбор J-сегмента человека IGKJ2 (IGKJ2*01), обладавшего максимальной гомологией. Конструирование с использованием зародышевой линии человека IGLV3-27*01 в качестве акцепторных каркасных областей.

Гуманизированная версия.

CDR крысы, определенный в соответствии с номенклатурой Kabat, пересадили на IGLV3-27*01, получив последовательность, подробно описанную ниже. Ряд каркасных остатков крысы, структурно важных для поддержания полноценной активности антитела, сохранили. Это позволило получить гуманизированную версию с 87,5% идентичностью (84 аминокислотных остатков из 96) по сравнению с зародышевой линией человека IGLV3-27*01.

```

<-----FR1-----><--CDR1--><----FR2----->
5A11-327-VLC SYELTQPSSVSVSPGQTARITCSGDVLSKRYAQWSQKPGQAIIVSVIY

<CDR2-><-----FR3-----><--CDR3-->
5A11-327-VLC KDSERPSGIPERFSGSSGTTATLTISGAQVEADYYCLSTYADDNL

<-----FR1-----><--CDR1--><----FR2----->
5A11-327-VLC SYELTQPSSVSVSPGQTARITCSGDVLSKRYAQWSQKPGQAIIVSVIY
IGLV3-27*01 .....A.K..R.F.....P.L...

<CDR2-><-----FR3-----><--CDR3-->
5A11-327-VLC KDSERPSGIPERFSGSSGTTATLTISGAQVEADYYCLSTYADDNL
IGLV3-27*01 .....V.....Y.A..N.-

```

Пример 7. Анализ перфорина/гранзима.

Цитотоксический потенциал, индуцируемый антителами против CRTAM, оценивали путем измерения продукции перфорина и гранзима В цитотоксическими CD8⁺ лимфоцитами после стимуляции. CD8 Т-клетки человека негативно выделяли из МПК здоровых доноров с помощью доступного для приобретения набора (Miltenyi Biotec). Выделенные CD8 клетки стимулировали иммобилизованным на планшете CD3 (ОКТ3, 0,1 мкг/мл) и различными дозами 5A11 в течение 4 дней. После стимуляции на планшете CD8 клетки обрабатывали РМА (25 нг/мл), иономицином (10 мкг/мл) и брэфелдином (10 мкг/мл) в течение 4 часов. Затем клетки промывали, фиксировали 4% PFA в течение 10 мин и окрашивали антителами к перфоруину и гранзиму В для проточной цитометрии, разбавленными PBS, содержащем 0,5% сапонина, в течение 15 мин. После окрашивания клетки дважды промывали PBS, содержащим 0,5% сапонина, и однократно буфером для FACS (PBS, содержащим 2% FCS и 2 мМ ЭДТА). Промытые клетки ресуспендировали в буфере для FACS и анализировали с помощью проточного цитометра Attune NxT (Fisher Scientific). Как подробно показано на фиг. 7 и 8, стимуляция с увеличением дозы 5A11 повышала цитотоксический потенциал CD8 Т-клеток в зависимости от дозы.

Пример 8. Анализ цитотоксичности Т-клеток.

Цитотоксичность Т-клеток в отношении клеток рака молочной железы MCF-7 при использовании антител против CRTAM оценивали с применением биспецифичного антитела против Her2/CD3 в качестве якоря для Т-клеток и клеток MCF-7. Дополнительную цитотоксичность наблюдали при добавлении антител против CRTAM в лунки для анализа, содержащие опухолевые клетки, МПК и биспецифичное антитело против Her2/CD3. Процент цитотоксичности, ассоциированной с действием антитела против CRTAM, рассчитывали как процент уничтожения по сравнению с клетками, не обработанными антителами против CRTAM.

Свежевыделенные МПК собирали центрифугированием в течение 5 мин при 1000 x g и разбавляли полноценной средой DMEM до концентрации 1,5Е⁶ клеток/мл. МПК разделяли на аликвоты и добавляли тестируемые антитела (антитело 5A11) до концентрации 20 мкг/мл. Клетки инкубировали на льду в течение

ние 10-20 мин. Клетки MCF-7 собирали и разбавляли до плотности $1,5E^6$ клеток/мл.

50 мкл полученных клеточных суспензий как МПК, так и MCF-7 добавляли в каждую лунку так, чтобы каждая лунка содержала 75000 МПК и клеток MCF-7. Биспецифичное антитело против Her2/CD3 серийно разбавляли полноценной средой DMEM, и 10 мкл этого разведения добавляли в каждую лунку, получая конечную концентрацию 5 мкг/мл в каждой лунке для анализа.

Необработанные лунки, содержавшие 50 мкл культуральной среды/лунку, представляли собой отрицательные контрольные образцы. Планшеты для анализа инкубировали в течение 96 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂. После инкубирования планшеты для анализа уравнивали до КТ в течение 30 минут. МПК удаляли и выбрасывали, оставляя клетки MCF-7 в лунках для анализа. Планшеты трижды промывали PBS при КТ и в каждую лунку добавляли 100 мкл PBS комнатной температуры. Реагент Cell Titer-Glo® (№ в каталоге G7572, Promega, Мэдисон, штат Висконсин, США) получали в соответствии с инструкциями производителя и распределяли по 100 мкл/лунку. Реагент несколько раз вводили и извлекали пипеткой в лунках для анализа с целью перемешивания и лизирования клеток. Планшет для анализа инкубировали в течение 15 мин в темноте. Люминесценцию регистрировали с использованием люциметра GloMax® (Promega) в соответствии с рекомендациями производителя.

Количество жизнеспособных клеток было пропорционально единицам люминесценции, их среднее значение рассчитывали для каждой концентрации в анализируемых лунках. Процент жизнеспособности рассчитывали с использованием лунок без тестируемого антитела в качестве контроля и наносили на график в зависимости от концентрации антитела.

Как видно на фиг. 9, добавление антитела 5A11 значительно увеличивало уровень цитотоксичности по сравнению с контролем без антитела 5A11.

Пример 9. ELISPOT с опухоль-инфильтрирующими лимфоцитами.

Первичные опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL), полученные из опухолей НМРЛ (Фиг. 10) или рака молочной железы (фиг. 11), стимулировали в течение 96 часов CR24.1, 5A11 или пембролизумабом, разбавленными до указанных концентраций, и ОКТ3, разбавленным до 1 мкг/мл полноценной средой RPMI. После стимуляции TIL собирали, подсчитывали и высевали на планшет для ELISPOT ИФН-γ (Mabtech) в количестве 100000 клеток/лунку. Планшет инкубировали при 37°C в течение 24 ч и впоследствии проявляли согласно инструкциям производителя. Количество пятен считывали с использованием анализатора ELISPOT ImmunoSpot® серии 5, данные анализировали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism.

На фиг. 10 показано, что антитело 5A11 активирует большее количество TIL, полученных из НМРЛ, что отражает значительно повышенную продукцию ИФН-γ по сравнению с коммерческим антителом CR24.1 или пембролизумабом.

На фиг. 11 показано, что антитело 5A11 и пембролизумаб активируют продукцию ИФН-γ в одинаковом количестве TIL, полученных из рака молочной железы.

Пример 10. ELISPOT зависимости "доза-ответ" с опухоль-инфильтрирующими лимфоцитами.

Первичные опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL), полученные из опухолей НМРЛ, стимулировали в течение 96 ч 5A11 в концентрации 0,1, 1,0 или 10 мкг/мл, пембролизумабом (10 мкг/мл) или ОКТ3, разбавленным до 1 мкг/мл полноценной средой RPMI. После стимуляции TIL собирали, подсчитывали и высевали на планшет для ELISPOT ИФН-γ (Mabtech) в количестве 100000 клеток/лунку. Планшет инкубировали при 37°C в течение 24 ч и впоследствии проявляли согласно инструкциям производителя. Количество пятен считывали с использованием анализатора ELISPOT ImmunoSpot® серии 5, данные анализировали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. На фиг. 12 показано, что все дозы 5A11 активировали продукцию повышенного количества ИФН-γ в TIL по сравнению с пембролизумабом.

Пример 11. МПК-опосредованная цитотоксичность с использованием набора Delfia®.

Клетки K562 окрашивали, как описано в наборе Delfia® (Promega). Окрашенные клетки K562 в качестве мишеней смешивали со МПК здоровых доноров (предварительно культивированными в течение 72 часов с ИЛ-2) при соотношении мишень:эффе́ктор, равном 1:20, в присутствии 5A11, CR24.1 или пембролизумаба, разбавленных до 10 мкг/мл. ИЛ-2 в концентрации 50 МЕ/мл использовали в качестве положительного контроля для анализа. Все условия повторяли в трех повторностях. Совместную культуру инкубировали при 37°C в течение 3 ч. Через 3 ч собирали 20 мкл супернатанта совместной культуры и анализировали их в соответствии с инструкциями производителя (Delfia® Promega). Результаты считывали с использованием планшет-ридера SpectraMax M5, регистрируя флуоресценцию с временным разрешением (TRF) при длине волны возбуждения 320 нм, длине волны излучения 615 нм, задержке 100 микросекунд, времени интегрирования 100 микросекунд. Все контроли, рекомендованные производителем для обеспечения возможности расчета специфичного лизиса, включили в анализ, и выполнили расчеты в соответствии с подробным описанием в инструкции к набору.

На фиг. 13 показано, что антитело 5A11 вызывало значительно усиленный лизис клеток по сравнению с коммерческим антителом CR24.1 или пембролизумабом.

Пример 12. Оценка in vivo противоопухолевой эффективности антитела 5A11 на модели НМРЛ че-

ловека HCC827 у мыши Mixeno NCG.

Изотипический контроль (10 мг/кг; BWx3) и антитело 5A11 (10 мг/кг; BWx3) тестировали на модели *in vivo*; каждая группа содержала 10 мышей. Каждую когорту делили пополам, в результате чего 5 мышам внутрибрюшинно вводили МПК, выделенных и полученных от одного из двух здоровых доноров-людей. Три дня спустя мышам подкожно вводили опухолевые клетки HCC827. Через день начали лечение тестируемыми антителами в соответствии со схемой приема, описанной выше. Выполняли мониторинг массы тела (BW), опухоли измеряли трижды в неделю. Мышей часто осматривали на предмет состояния здоровья и побочных эффектов. Мышей умерщвляли при наличии признаков реакции "трансплантат против хозяина". Результат лечения определяли по ингибированию роста опухоли (TGI), мере разности среднего объема опухоли в экспериментальной группе по сравнению с контрольной группой, измеренной в указанный день исследования. На фиг. 14 продемонстрировано, что через 15 дней опухоли у мышей, получавших антитело 5A11, были значительно меньше, чем у животных, получавших контрольное изотипическое антитело.

Пример 13. Сродство связывания гуманизованного антитела 5A11.

Сродство связывания гуманизованного антитела 5A11 определяли с помощью Octet® (ForteBio) с использованием биосенсоров для захвата антител против hIgG (№ в каталоге 18-5060).

Биосенсоры ForteBio для захвата антител против IgG-Fc человека (АНС) загружали тестируемыми антителами в концентрации 1 мкг/мл в течение 300 с.

Нагруженные биосенсоры инкубировали с 5 концентрациями рекомбинантного химерного белка hCRTAM/Fc человека, начиная с 200 нМ, которые последовательно разбавляли в соотношении 1:3; контрольная лунка содержала только кинетический буфер (для коррекции дрейфа).

Данные для всех концентраций аппроксимировали с использованием глобальной аппроксимации 1:1 для каждого образца. По возможности определяли кинетические скорости ассоциации и диссоциации, а также значения K_D .

Анализ показал, что гуманизованное антитело 5A11 обладало характеристиками, показанными ниже в табл. 2.

Таблица 2

Образец	K_D (нМ)	k_{on} (1/Мс)	k_{off} (1/с)	R_{max} (нМ)	Полный χ^2	Полный R^2
5A11	0,439	$2,49 \times 10^5$	$1,10 \times 10^{-4}$	0,27	0,06	1,00

Список последовательностей

SEQ ID	Описание	Последовательность
1	5A11_VH_aa	AVQLVESGGGLVQPKESLKISCAASGFTFSDAAMYWVROAPGKG LEWVARIRTKTNNYAAHYVESVKGRFTVSRDDSKSMVYLQMDNL KTDDTAMYYCTSVPGQTQDYWGQGMVTVSS
2	5A11_VL_aa	SYELIQPPSASVTLGNTVSLTCVGDLSKRYVQWSQOKPKDTIVSV IYKDSERPSGISDRFSGSSGTTATLTIHGTLAEDEADYYCLSTYSD DNLPLVFGGGTKLTVL
3	5A11_VH_nt	atgftggctgctcagtggtggtgactgctcttttcaagtggtcattgtgctgacagctgttgagctg gtggaggattggtgcagcctaaggagtcattgaaatctcatgtgcagcctctggattcacgtcagtgatg ctgcatgtactgggtcgcagcctcaggaaggctctggaatgggtgctgacatcgaactaataa ctaataatgacagcgcattatgtagtcagtgaaaggcagattcaccgtctccagagatgattcaaaaa gcatggtctacctacaatggataactgaaaactgatgacacagccatgtattactgtacgtcagctcccc aaggaacgcaggattactgggccaaggatcatgtcacagctctctca
4	5A11_VL_nt	atggcctgggtctctctgttctacctctgctctctctgtatgcaggttatgtgacagctatgattgatccaa ccacctcggcctcagtcactctgggaaactgtctcactcactgtgtcggagatgaatatacaaaaagat atgtcagtgctcaaaaaagccagacaagaccattgtgtccgtgatacaaaagatagcagcggccc ctcagcactctgaccgattctctggtccagctccgggacaacagccactctgacaatccatggcacct ggctgaggatgagctgattactgtttgcaacatagtagatgataatctcctgtgtcgtggtggaa ccaagctcactgtcta
5	5A11_VH_CDR1_a	DAAMY
6	5A11_VH_CDR2_a	RIRTKTNNYAAHYVESVKG
7	5A11_VH_CDR3_a	VPQGTQDY
8	5A11_VL_CDR1_a	VGDELSKRYVQ
9	5A11_VL_CDR2_a	KDSERPS
10	5A11_VL_CDR3_a	LSTYSDDNLPV
11	CRTAM (O95727)	MWWRVLSLLAWFPLQEASLTNHTETITVEEGQTLTLKCVTSLRKN SSLQWLTPSGFTIFLNEYPAKNSKYQLLHHSANQLSITVNPVTLQ DEGVYKCLHYSDSVSTKEVKVIVLATPFKPILEASVIRKQNGEEHV VLMCSTMRSKPPPQITWLLGNSMEVSGGTLHEFETDGKKCNTTST LIHTYGKNSTVDCIHRHRLQGRKLVAPFRFEDLVTEETASDALE RNSLSSQDPQPTSTVSVTESSSTSEIDKEEKEQTQDPDLTTEANP QYVGLARKKSGILLTLVSLFILFIIVQLFIMKLRKAHVIVKKE VSEHTLESYRSRNNNEETSSEKNGQSSHPMRCMNYITKLYSEAKT KRKENVQHSKLEEKHIQVPESIV
12	CRTAM ECD (AK 18 - 287 SEQ ID NO:11)	SLTNHTETITVEEGQTLTLKCVTSLRKNSSLQWLTPSGFTIFLNEYPA ALKNSKYQLLHHSANQLSITVNPVTLQDEGVYKCLHYSDSVSTKE VKVIVLATPFKPILEASVIRKQNGEEHVLMCSTMRSKPPPQITWLL GNSMEVSGGTLHEFETDGKKCNTTSTLIHTYGKNSTVDCIHRHRL QGRKLVAPFRFEDLVTEETASDALERNLSSQDPQPTSTVSVTE DSSTSEIDKEEKEQTQDPDLTTEANPQYVGLARKKSG
13	5A11_VHA_aa	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSDAAMYWVRQASGKG LEWVARIRTKTNNYAAHYVESVKGRFTVSRDDSKNTVYLQMNLSL KTEDTAMYYCTSVPGQTQDYWGQGLTVTVSS
14	5A11_VLC327_aa	
		SYELTQPSSVSVPQGTARITCSGDVLSKRYAQWSQOKPGQAIQVSV IYKDSERPSGIPERFSGSSGTTATLTISGAQVEDEADYYCLSTYAD DNLPLVFGGGTKLTVL
15	5A11_VLC327_CD R1	SGDVLSKRYAQ
16	5A11_VLC327_CD R3	LSTYADDNLPV
17	5A11_VHA_Fc_aa	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSDAAMYWVRQA SGKGLEWVARIRTKTNNYAAHYVESVKGRFTVSRDDSKNT VYLQMNLSLKTEDTAMYYCTSVPGQTQDYWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVIVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KAFAPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**
18	5A11_VLC327_Fc_ aa	SYELTQPSSVSVPQGTARITCSGDVLSKRYAQWSQOKPGQAIQVSV IYKDSERPSGIPERFSGSSGTTATLTISGAQVEDEADYYCLSTYAD DNLPLVFGGGTKLTVLQPKAAPSVTLPFPSSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTP EQWKSHRYSYQVTHEGSTVEKTVAPTECS*

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающиеся с CRTAM, причем указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит варибельную область тяжелой цепи, содержащую:

последовательность CDR-H1, содержащую SEQ ID NO:5;
 последовательность CDR-H2, содержащую SEQ ID NO:6; и
 последовательность CDR-H3, содержащую SEQ ID NO:7, и
 варибельную область легкой цепи, содержащую:

последовательность CDR-L1, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:15;

последовательность CDR-L2, содержащую SEQ ID NO:9; и

последовательность CDR-L3, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:16.

2. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, отличающиеся тем, что варибельная область легкой цепи содержит: CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:8; CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:9; и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:10.

3. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, отличающиеся тем, что варибельная область легкой цепи содержит: CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:15; CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:9; и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:16.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающиеся с CRTAM, причем указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит:

i) 3 CDR тяжелой цепи из SEQ ID NO:1 и 3 CDR легкой цепи из SEQ ID NO:2 или

ii) 3 CDR тяжелой цепи из SEQ ID NO:13 и 3 CDR легкой цепи из SEQ ID NO:14; где CDR заданы в соответствии с системой нумерации по Kabat или Chothia.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4, содержащие: варибельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную последовательности SEQ ID NO:13, и варибельную область легкой цепи, содержащую последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную последовательности SEQ ID NO:14.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.5, содержащие варибельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:13, и варибельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:14.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляют собой моноклональное антитело.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.7, отличающиеся тем, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляют собой химерное, гуманизованное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или антитело человека или антигенсвязывающий фрагмент.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляют собой рекомбинантное антитело IgG1 или антигенсвязывающий фрагмент, полученные в условиях сайленсинга Fc и характеризующиеся уменьшенным или отсутствующим связыванием с одним или более Fc-рецепторами.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент способны индуцировать и/или усиливать цитотоксичность Т-клеток.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из: Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, Fv, scFv и однодоменного антитела.

12. Полинуклеотид, кодирующий варибельную область тяжелой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из предыдущих пунктов.

13. Полинуклеотид, кодирующий варибельную область легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из предыдущих пунктов.

14. Экспрессирующий вектор, содержащий полинуклеотид по п.12 и полинуклеотид по п.13.

15. Клетка-хозяин, содержащая:

i) экспрессирующий вектор, содержащий полинуклеотид по п.12 и полинуклеотид по п.13; или

ii) первый экспрессирующий вектор, содержащий полинуклеотид по п.12, и второй экспрессирующий вектор, содержащий полинуклеотид по п.13.

16. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий культивирование клетки-хозяина по п.15 в условиях, в которых антитело или антигенсвязывающий фрагмент экспрессируется в клетке-хозяине.

17. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-11 и фармацевтически приемлемый носитель.

18. Способ лечения субъекта, страдающего раком, включающий введение субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-11 или фармацевтической композиции по п.17.

19. Способ по п.18, отличающийся тем, что указанный рак выбран из группы, состоящей из мелко-клеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (включая плоскоклеточный рак и аденокарциномы), рака кожи, включая меланому, рака молочной железы (включая TNBC), рака ободочной и прямой кишки, рака желудка, рака яичника, рака шейки матки, рака предстательной железы, рака почки, рака печени, включая гепатоцеллюлярную карциному, рака поджелудочной железы, рака головы и шеи, рака носоглотки, рака пищевода, рака мочевого пузыря и других видов уроэпителиального рака, рака желудка, глиомы, глиобластомы, рака яичка, рака щитовидной железы, рака костей, рака желчного пузыря и желчных протоков, рака матки, рака надпочечников, саркомы, ЖКСО (GIST), нейроэндокринных опухолей и гематологических злокачественных новообразований.

20. Способ по п.18 или 19, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция дополнительно содержит эффективное количество второго терапевтического агента.

21. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-11 или фармацевтической композиции по п.17 для получения лекарственного средства для лечения рака.

22. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-11 или фармацевтической композиции по п.17 в лечении рака.

23. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-11 или фармацевтической композиции по п.17 в качестве лекарственного средства для лечения рака.

24. Применение по любому из пп.21-23, отличающееся тем, что указанный рак выбран из группы, состоящей из мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (включая плоскоклеточный рак и аденокарциномы), рака кожи, включая меланому, рака молочной железы (включая TNBC), рака ободочной и прямой кишки, рака желудка, рака яичника, рака шейки матки, рака предстательной железы, рака почки, рака печени, включая гепатоцеллюлярную карциному, рака поджелудочной железы, рака головы и шеи, рака носоглотки, рака пищевода, рака мочевого пузыря и других видов уроэпителиального рака, рака желудка, глиомы, глиобластомы, рака яичка, рака щитовидной железы, рака костей, рака желчного пузыря и желчных протоков, рака матки, рака надпочечников, саркомы, ЖКСО (GIST), нейроэндокринных опухолей и гематологических злокачественных новообразований.

25. Применение по любому из пп.21-24, отличающееся тем, что фармацевтическая композиция или лекарственное средство дополнительно содержит эффективное количество второго терапевтического агента.

VH-цепь 5A11, SEQ ID NO: 1

AVQLVESGGGLVQPKE^{SLKISCAASGFTFS}DAAMYWVRQAPGKLEWVA^{RIRTKTN^{NY}AAHY}
VESVKG^{RFTVSRD^{DSKSMVYLQMDNLKTD^{DTAMYYCTS}V}PQGTQDY}WGQGVMTVSS

Фиг. 1a

VL-цепь 5A11, SEQ ID NO: 2

SYELIQPPSASVTLGNTVSLTC^{VGDELSKRYVQ}WSQQKPKD^{TIIVSVIY}KDSE^{RPS}GISDRFS
GSSSGTTATLTIHGTLAEDEADYYC^{LSTYSDDNLPV}FGGGTKLTVL

Фиг. 1b

VH-цепь 5A11 (гуманизованного), SEQ ID NO: 13

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLS^{CAASGFTFS}DAAMYWVRQASGKLEWVA^{RIRTKTN^{NY}AAHY}
VESVKG^{RFTVSRD^{DSKNTVY^{LQMN}SLKTEDTAMYYCTS}V}PQGTQDYWGQGLTVTVSS

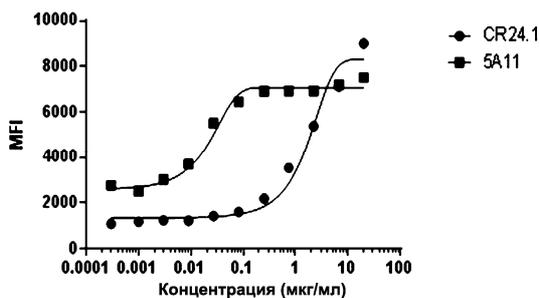
Фиг. 2a

VL-цепь 5A11 (гуманизованного), SEQ ID NO: 14

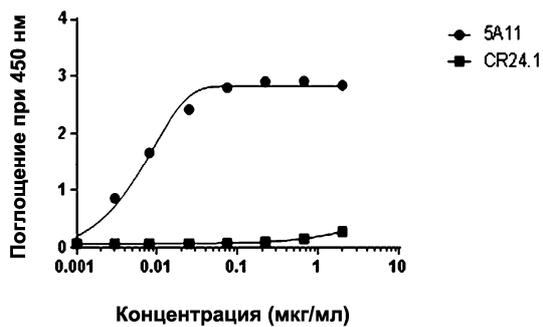
SYELTQPPSSVSPGQTARITC^{SGDVLSKRYAQ}WSQQKPGQAI^{IVSVIY}KDSE^{RPS}GIPERFS
GSSSGTTATLTISGAQVEADYYC^{LSTYADDNLPV}FGGGTKLTVL

Фиг. 2b

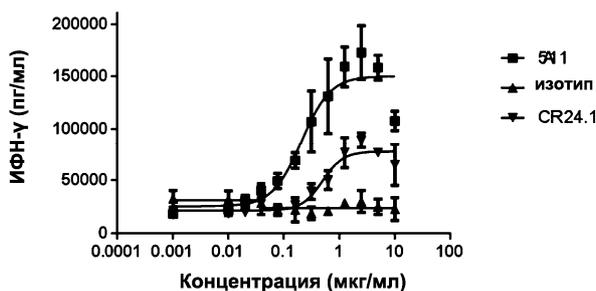
043510



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5

```
SEQ_ID_No1    1  AVQLVESGGGLVQPKESELKISCAASGFTFSDAAMYWVRQAPGKGLEWVAR    50
               .|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||
SEQ_ID_No13   1  EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSDAAMYWVRQASGKGLEWVAR    50

SEQ_ID_No1    51  IRTKTNNYAAHYVESVKGRFTVSRDSDKSMVYLQMDNLKTDDTAMYICTS    100
               |||||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||
SEQ_ID_No13   51  IRTKTNNYAAHYVESVKGRFTVSRDSDKNTVYLQMNLSKTEDTAMYICTS    100

SEQ_ID_No1    101 VPQGTQDYWGQVMVTVSS    119
               |||||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||
SEQ_ID_No13   101 VPQGTQDYWGQGLVTVSS    119
```

Фиг. 6a

```
SEQ ID NO2    1  SYELIQPPASVTLGNTVSLTCVGDLSKRYVQWSQQKPKDTIVSVIYKD    50
               ||||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||
SEQ ID NO14   1  SYELTQPSVSVSPGQTARITCSGDVLSKRYAQWSQQKPGQAIVSVIYKD    50

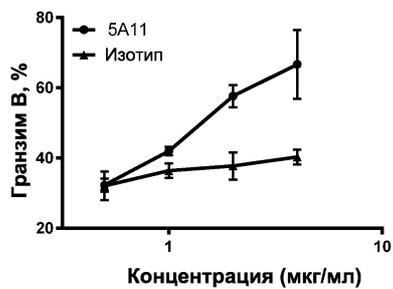
SEQ ID NO2    51  SERPSGISDRFSGSSSGTTATLTIHGTLAEDEADYYCLSTYSDDNLPVFG    100
               |||||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||
SEQ ID NO14   51  SERPSGIPERFSGSSSGTTATLTIISGAQVEADYYCLSTYADDNLPVFG    100

SEQ ID NO2    101 GGTKLTVL    108
               |||||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||..|||
SEQ ID NO14   101 GGTKLTVL    108
```

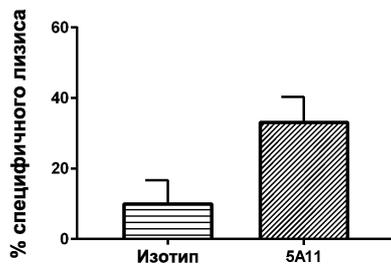
Фиг. 6b



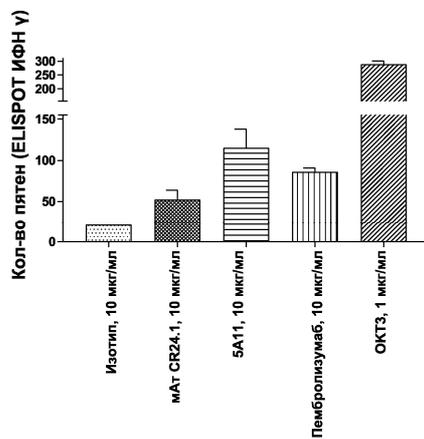
Фиг. 7



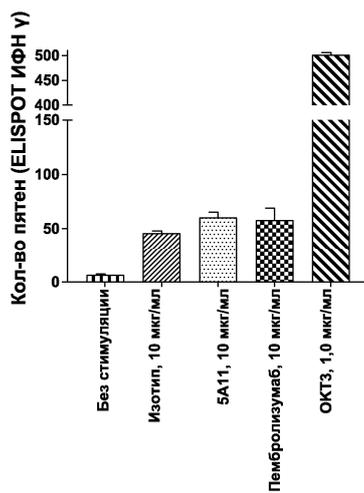
Фиг. 8



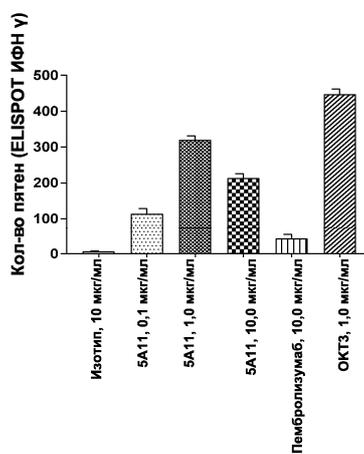
Фиг. 9



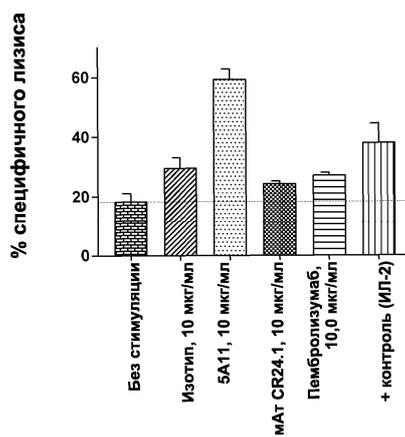
Фиг. 10



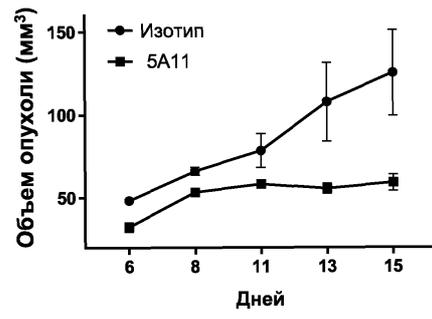
Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14

